

**Zum Nachweis von Endotoxinen gramnegativer Keime
in Milch mit dem Limulus-Test**

Susanne Buchholz-Berchtold

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555615_0073

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
Fachbereich Tiermedizin der Universität München
Lehrstuhl: Professor Dr. G. Terplan

Zum Nachweis von Endotoxinen gramnegativer Keime in Milch
mit dem Limulus-Test

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München



von
Susanne Buchholz-Berchtold
aus
Tegernsee

München 1977

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Professor Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Professor Dr. G. Terplan

Korreferent: Professor Dr. B. Gedek

Tag der Promotion: 29. Juli 1977



Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	2
2.1. Endotoxine gramnegativer Keime	2
2.1.1. Definition	2
2.1.2. Struktur und Eigenschaften	3
2.2. Nachweisverfahren	6
2.2.1. Pyrogennachweis mit dem Kaninchentest	7
2.2.2. Mäuse-Letalitätstest	8
2.2.3. Hühnerembryo-Letalitätstest	9
2.2.4. Limulus-Test	10
3. Eigene Untersuchungen	22
3.1. Material und Methodik	22
3.1.1. Reaktion von Reinkulturen gramnegativer und gram- positiver Bakterien sowie Hefen im Limulus-Test	22
3.1.1.1. Limulus-Test	23
3.1.2. Keimzahl und Endotoxingehalt während verschiedener Wachstumsphasen gramnegativer Keime	24
3.1.3. Freisetzung von Endotoxin durch Zerstörung der Zell- wand gramnegativer Keime	25
3.1.4. Nachweis von Endotoxinen gramnegativer Keime in Milch mittels Limulus-Test	27
3.1.4.1. Vorkommen von Endotoxinen in roher und er- hitzter Milch	27
3.1.4.2. Freisetzung von Endotoxin in roher und er- hitzter Milch durch Zerstörung der Zellwand gramnegativer Keime	27
3.2. Ergebnisse	28
3.2.1. Reaktion von Reinkulturen gramnegativer und gram- positiver Bakterien sowie Hefen im Limulus-Test	28

3.2.2. Keimzahl und Endotoxingehalt während verschiedener Wachstumsphasen gramnegativer Keime	30
3.2.3. Freisetzung von Endotoxin durch Zerstörung der Zellwand gramnegativer Keime	31
3.2.4. Nachweis von Endotoxinen gramnegativer Keime in Milch mittels Limulus-Test	34
3.2.4.1. Vorkommen von Endotoxinen in roher und erhitzter Milch	34
3.2.4.2. Freisetzung von Endotoxin in roher und erhitzter Milch durch Zerstörung der Zellwand gramnegativer Keime	36
4. Diskussion	42
5. Zusammenfassung	50
Summary	51
6. Literaturverzeichnis	52

1. Einleitung

Lipopolysaccharide gramnegativer Keime (Endotoxine) sind lebensmittelhygienisch möglicherweise in zweifacher Hinsicht von Bedeutung. Einerseits können sie, da sie im Gegensatz zu den Keimen äußerst hitzestabil sind, die hygienische Beschaffenheit eines Lebensmittels auch nach einem Erhitzungsprozeß anzeigen. Zum anderen ist – auch wenn eine Toxizität für den gesunden Menschen nach oraler Aufnahme von den meisten Autoren bezweifelt wird – nicht auszuschließen, daß Endotoxine durch andere Stoffe in ihrer Wirkung potenziert werden und zu Erkrankungen Anlaß geben können.

Der Nachweis der Endotoxine gramnegativer Keime war bis vor einigen Jahren in Ermangelung praktikabler Verfahren mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Der auf einer Reaktion zwischen Endotoxin und Amöbozytenlysat des Pfeilschwanzkrebses (*Limulus polyphemus*) beruhende, von LEVIN und BANG 1964 entwickelte sogenannte Limulus-Test hat aufgrund der hohen Empfindlichkeit sowie des geringen Zeit- und Kostenaufwands im Rahmen der klinischen Diagnostik (Endotoxämie) wie auch der Kontrolle parenteral zu verabreichender Arzneimittel in letzter Zeit große Bedeutung erlangt.

Aufgabe dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob der Limulus-Test auch zum Nachweis von Endotoxinen gramnegativer Keime in roher und erhitzter Milch geeignet ist und ob das Ergebnis für die Beurteilung der hygienischen Qualität von Milch herangezogen werden kann. Außerdem sollte die Spezifität des Limulus-Tests an aus Lebensmitteln isolierten Reinkulturen gramnegativer bzw. grampositiver Keime und Hefen geprüft werden. Schließlich sollte in Modellversuchen mit *Escherichia coli* ermittelt werden, welche Beziehung zwischen der Anzahl kolonienbildender Einheiten und dem Reaktionsausfall des Limulus-Tests besteht.

2. Schrifttum

2.1. Endotoxine gramnegativer Keime

2.1.1. Definition

Die Bezeichnung "Endotoxin" leitet sich von der ursprünglichen Annahme ab, daß das toxische Prinzip der gramnegativen Bakterien nur im Innern der Bakterienzelle lokalisiert ist und eine Zerstörung der Zelle für die Freisetzung von Endotoxin unbedingt erforderlich ist (MILNER, RUDBACH und RIBI, 1971; URBASCHEK, 1976). Später konnte dann von BOIVIN gezeigt werden, daß Endotoxin in Form eines Lipopolysaccharid-Komplexes aus intakten Bakterienzellen extrahiert werden kann (RIBI et al., 1964), ohne allerdings auch zu beweisen, daß das Endotoxin in der Zellwand lokalisiert ist (RAYNAUD und ALOUF, 1970). Nach 1950 gelang es dann verschiedenen Forschern (MILNER, RUDBACH und RIBI, 1971) nachzuweisen, daß die Endotoxine - wie auch Proteine und Lipide des Cephalin-Typs (LÜDERITZ et al., 1971) - Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Keime sind. Nach URBASCHEK (1976) setzt sich die äußere Membran, die als eine Einheit betrachtet wird, aus zwei Schichten zusammen. Sie besteht aus Lipopolysaccharid - d.h. dem Endotoxin bzw. O-Antigen - und Lipoprotein. Die beiden folgenden Zellwandeinheiten sind die solide Membran aus Mucopeptiden und die vorwiegend aus Lipid und Protein bestehende Plasmamembran, die das Zytoplasma umschließt. Bei den meisten gramnegativen Keimen ist die endotoxinhaltige Schicht so fest mit anderen Bestandteilen der Zellwand verbunden, daß die Freisetzung von Endotoxin eine Behandlung der Kulturen mit sehr wirksamen Reagenzien erfordert (NOWOTNY, 1969). Bei einigen gramnegativen Keimen wird Endotoxin auch schon bei Anwendung milderer Extraktionsverfahren freigesetzt, bei anderen sogar spontan - "freies Endotoxin" - (TAYLOR, KNOX und WORK, 1966; CRUTCHLEY, MARSH und CAMERON, 1967 und 1968). Diese Erkenntnisse sprechen somit zwar gegen den Gebrauch der Bezeichnung "Endotoxin", doch ist diese nach Ansicht von MILNER, RUDBACH und

RIBI (1971) die beste für ein "mysteriöses bakterielles Stoffwechselprodukt", das nach Infektion - insbesondere bei Säugern - erhebliche pathophysiologische Veränderungen bewirken kann. Der Alternativvorschlag der letztgenannten Autoren, das toxische Prinzip der gramnegativen Keime als "endotoxisches Phospholipopolysaccharid" zu bezeichnen, hat sich nicht durchgesetzt. Häufiger ist in der Literatur die bereits erwähnte Bezeichnung "Lipopolysaccharid" zu finden, mit der ein Hinweis auf die Komponenten des Endotoxins gegeben wird.

2.1.2. Struktur und Eigenschaften

Bei den sehr hitzestabilen (WELCH et al., 1945; MILNER, RUBACH und RIBI, 1971) Endotoxinen oder Lipopolysacchariden (LPS), die außer endotoxischen auch pyrogene Eigenschaften aufweisen und die somatischen O-Antigene gramnegativer Keime darstellen, handelt es sich um Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von mehreren Millionen (NOWOTNY, 1969; LÜDERITZ et al., 1971). Endotoxin oder LPS besteht aus zwei Komponenten unterschiedlich physico-chemischen Charakters: einem Heteropolysaccharid (O-spezifische Kette und Kern) und einem kovalent gebundenen Lipoid A (LÜDERITZ et al., 1971; 1973). Beim Heteropolysaccharid können zwei Regionen voneinander abgegrenzt werden: Die O-spezifischen Polysaccharide (Region I) und die Kern-Polysaccharide (Region II). Die Anordnung der Polysaccharid-Kette - bekannte wie auch sehr ungewöhnliche lipophile Zucker - ist ausschlaggebend für Art-spezifität und verschiedene Mutanten (LÜDERITZ, 1975). Sie enthält die Antigen-determinanten Gruppen (RIETSCHEL und LÜDERITZ, 1975; WESTPHAL, 1975) und ist Grundlage für die serologische Differenzierung - so auch für das KAUFFMANN-WHITE-SCHEMA (URBASCHKE, 1976). Die Struktur und Zusammensetzung der Kern-Polysaccharide ist gruppenspezifisch, z.B. identisch bei Keimen des Genus Salmonella (GALANOS, 1975; RIETSCHEL und LÜDERITZ, 1975). Die Kernpolysaccharide sind mit dem Lipoid A (Region III) über ein 2-Keto-3-Desoxyoctonat (KDO)-Trisaccharid verknüpft. Beim Lipoid A handelt es sich im wesentlichen um einen Komplex

von zwei mit Phosphorsäure verbundenen Glucosamindisacchariden, welche mit einer Anzahl langkettiger Fettsäuren verestert sind. Die Struktur des Lipoids A der verschiedenen Enterobacteriaceae ist ziemlich ähnlich, wenn nicht sogar identisch (GALANOS, 1975). Weitere Details über physico-chemische Eigenschaften und Struktur von Endotoxinen finden sich in verschiedenen Publikationen in den Sammelwerken von LANDY und BRAUN (1964), KADIS, WEINBAUM und AJL (1971), WEINBAUM, KADIS und AJL (1971), KASS und WOLFF (1973) sowie URBASCHEK, URBASCHEK und NETER (1975).

WESTPHAL und Mitarbeiter, die Anfang der fünfziger Jahre die lipoidhaltige Komponente des Endotoxins isoliert sowie analysiert und als Lipoid A (WESTPHAL und LÜDERITZ, 1954) bezeichnet hatten, gingen bereits seinerzeit davon aus, daß diese Komponente für die toxischen Eigenschaften verantwortlich sei. Ein absolut schlüssiger Beweis konnte damals jedoch nicht geführt werden (WESTPHAL, 1975). Die Arbeitsgruppe um RIBI kam dagegen zu dem Ergebnis, daß das Lipoid A nicht die endotoxische Determinante ist (MILNER, RUDBACH und RIBI, 1971; NOWOTNY, 1971; WESTPHAL, 1975). Sie vertrat vielmehr die Ansicht, daß veresterte langkettige Fettsäuren und zumindest einige Kohlehydrate essentielle Komponenten des Endotoxins seien und daß die Toxizität auf einen Komplex einzelner für sich unschädlicher Komponenten zurückzuführen sei (MILNER, RUDBACH und RIBI, 1971). In den letzten Jahren publizierte Ergebnisse lassen jedoch die Schlußfolgerung zu, daß die biologische Aktivität der Endotoxine nicht auf die O-spezifischen Polysaccharidketten oder die Kern-Polysaccharide zurückzuführen ist (LÜDERITZ et al., 1971). Verschiedene Versuche haben nämlich gezeigt, daß das kleinste komplette Glycolipid, das nur KDO und Lipoid A enthielt, ein potentes Endotoxin war, das sich in seiner Wirkung von Lipopolysacchariden aus S-Formen kaum unterscheiden ließ. Nach Entfernung des KDO aus dem Glycolipid war das freie, wasserunlösliche Lipoid A nur von sehr geringer Aktivität. Da aber durch Veränderung von KDO im Glycolipid dessen endotoxische Eigenschaften nicht herab-

gesetzt wurden und außerdem freies Lipoid A in einem wasserlöslichen Komplex - z.B. mit bovinem Serumalbumin - im allgemeinen die gleiche Toxizität aufwies wie das als Ausgangsmaterial dienende Endotoxin, wurde von LÜDERITZ et al. (1971 und 1973) gefolgert, daß die lyophile Polysaccharidkomponente als Lösungsvermittler für das wasserunlösliche Lipoid A dient und daß das Lipoid A das Zentrum der biologischen Aktivität im Endotoxin (LPS)-Molekül darstellt (LÜDERITZ et al., 1971 und 1973; NOWOTNY, 1971; GALANOS, 1975; LÜDERITZ, 1975). Die These, daß das Lipoid A tatsächlich für die biologische Aktivität verantwortlich ist, wurde durch vergleichende Untersuchungen mit Endotoxinen einerseits und Lipoid A andererseits in vitro (Limulus-Test) wie auch in verschiedenen in vivo-Tests (GALANOS, 1975) bestätigt.

Eine Vielzahl von Publikationen befaßt sich mit den verschiedenen biologischen Effekten parenteral aufgenommener Endotoxine. Die Erforschung der biologischen Wirkung stößt jedoch auf verschiedene Schwierigkeiten; dazu zählt u.a die Tatsache, daß fast jeder herangezogene Parameter durch Endotoxine in irgendeiner Weise verändert wird (URBASCHKE, 1976). Außerdem hat sich gezeigt, daß die mit verschiedenen Extraktionsverfahren (JOHNSON und PERRY, 1976) gewonnenen Endotoxine zum Teil unterschiedliche Wirkungen aufweisen. Die erste als Endotoxineffekt identifizierte Reaktion war die fiebererregende Wirkung (NOWOTNY, 1971). Weitere endotoxische Reaktionen sind nach NOWOTNY (1969) sowie MILNER, RUDBACH und RIBI (1971) u.a. Letalität (die LD_{50} einer üblichen Endotoxinzubereitung liegt nach NOWOTNY (1971) bei 200 - 400 mcg/Maus, die letale Dosis bei Botulinum-Toxin A beträgt $2,5 \times 10^{-5}$ mcg/Maus), dermale Shwartzman-Reaktion, generalisierte Shwartzman-Reaktion, Epinephrin-Reaktion, hämorrhagische Nekrose von Tumoren, primärer entzündlicher Effekt in der Haut, unspezifische Resistenz gegenüber Infektionen, Schutz vor Strahlenschäden, hämodynamische Effekte, Störung des Stoffwechsels sowie der Wasser- und Nahrungsaufnahme, Zytotoxizität, Stimulation der Interferon-Produktion, Adjuvans-Effekte, Ausbildung einer Endotoxin-Toleranz, Antikörperbildung gegenüber Endo-

toxinen, Abort, Arthritis, Freisetzung endogenen Pyrogens, Leukopenie und Leukozytose, Beeinflussung des RES, Veränderung der Blutgerinnung, endokrinologische Veränderungen, Freisetzung und Sensitivierung gegenüber Histamin, Interaktion mit Komplement. Dieser Katalog ist jedoch - wie auch neuere Publikationen (z.B. KASS und WOLFF, 1973; URBASCHEK, URBASCHEK und NETER, 1975; URBASCHEK, 1976) gezeigt haben - keinesfalls vollständig. Auf Einzelheiten wie auch auf die Wirkungsweise der Endotoxine soll an dieser Stelle jedoch nicht eingegangen werden; diese können u.a. den bereits erwähnten Publikationen wie auch zusammenfassenden Übersichten bei LANDY und BRAUN (1964), KADIS, WEINBAUM und AJL (1971) sowie WEINBAUM, KADIS und AJL (1971) entnommen werden.

2.2. Nachweisverfahren

Der Nachweis der Endotoxine gramnegativer Keime war bis vor einigen Jahren in Ermangelung einfacher Verfahren mit erheblichen Aufwendungen verbunden. Anwendung fanden verschiedene in vivo-Methoden, von denen dem Pyrogentest am Kaninchen, dem Mäuse-Letalitätstest und dem Hühnerembryo-Letalitätstest die größte Bedeutung zukamen. Der Nachteil derartiger in vivo-Verfahren liegt u.a. darin, daß die Reaktionen von verschiedenen Spezies nicht immer gleichartig sind - z.B. Hyperthermie bei Kaninchen, Pferd, Mensch einerseits und Hypothermie bei Ratte, Maus, Meerschweinchen andererseits - und daß sogar innerhalb einer Spezies erhebliche Unterschiede bestehen können (SULZER, 1971). Um quantitativ unterschiedliche Ergebnisse innerhalb einer Spezies weitgehend ausschließen zu können, forderten u.a. HASKINS et al. (1961), daß die verwendeten Tiere uniform sein müssen, was Stamm, Herkunft, Gewicht und Alter betrifft. Außerdem müssen die Versuchsgruppen ausreichend groß sein, um die erhaltenen Resultate statistisch absichern zu können. Schließlich ist auch daran zu denken, daß die Veränderung der Umweltbedingungen die Ergebnisse erheblich verfälschen kann (SULZER, 1971). Aufgrund der Problematik der in vivo-Verfahren hat es nicht an Versuchen gefehlt, einfachere, aber gleichwertige in vitro-

Methoden zu entwickeln. Von diesen hat sich bisher nur der sogenannte Limulus-Test (LEVIN und BANG, 1964) bewährt, der einfach und rasch durchführbar ist, große Empfindlichkeit aufweist, geringe Probenvolumina erfordert und relativ kostengünstig ist (FRAUCH, 1974 a). Im folgenden soll kurz auf einige der in vivo-Tests - und zwar Pyrogentest am Kaninchen (2.2.1.), Mäuse-Letalitätstest (2.2.2.) bzw. Hühnerembryo-Letalitätstest (2.2.3.) - sowie ausführlich auf den Limulus-Test (2.2.4.) eingegangen werden.

2.2.1. Pyrogennachweis mit dem Kaninchentest

Dieser auch "rabbit pyrogen test" genannte Test ist nach FRAUCH (1974 a) und MARCUS (1975) das bis heute einzige von den Gesundheitsbehörden weltweit anerkannte Nachweisverfahren und beruht im Prinzip auf der Feststellung eines etwaigen rektal gemessenen Temperaturanstiegs beim Kaninchen nach intravenöser Injektion der zu testenden Probe. Pro Prüfsubstanz werden drei Tiere verwendet. Entsprechend der Angaben des DAB 7 (1968) gilt ein Material als pyrogenhaltig, wenn die Summe der Quadrate der bei den drei Versuchstieren beobachteten maximalen Temperatursteigerungen (Differenz zwischen dem Höchstwert aller Messungen nach der Injektion und Ausgangswert) mehr als 1,6 beträgt. Nach den Bestimmungen der Europäischen Pharmacopöe können diejenigen Substanzen als pyrogenfrei angesehen werden, bei denen die Summe der Maximaltemperatursteigerungen der drei Kaninchen den Wert $1,15^{\circ}\text{C}$ nicht erreicht (RONNEBERGER und STÄRK, 1974). Auf andere Auswertungen und Beurteilungen (KEENE, SILBERMAN und LANDY, 1961; MARTIN und MARCUS, 1964; GREISMAN und HORNICK, 1969; u.a.) soll hier nicht eingegangen werden. Dieses Testverfahren erfordert erfahrenes Personal und klimatisierte Räume für die Kaninchen, so daß die Untersuchungen ziemlich kostspielig und zeitaufwendig werden. Auch die Auswahl der geeigneten Tiere und die Bestimmung ihrer Ansprechbarkeit auf Pyrogene ist mit besonderen Schwierigkeiten verbunden (RONNEBERGER und STÄRK, 1974). Einzelne Lösungen können aus physiologischen Gründen nur verdünnt geprüft werden,

wobei die Empfindlichkeit der Methode entsprechend abnimmt. Andere Substanzen wiederum bewirken eine Senkung der Körpertemperatur und verfälschen das Prüfungsergebnis (FRAUCH, 1974 a). Da als fiebererregende Substanzen neben Endotoxinen gramnegativer Bakterien auch Viren, Pilze und viele chemische Verbindungen (Krampfgifte, Tropanalkaloide, Redoxfarbstoffe u.a.) in Frage kommen, ist die Abgrenzung sehr schwierig (RONNEBERGER und STÄRK, 1974).

2.2.2. Mäuse-Letalitätstest

Beim Mäuse-Letalitätstest wird im allgemeinen so vorgegangen, daß jeweils aus mindestens fünf Mäusen bestehenden Gruppen das zu untersuchende Material intraperitoneal - seltener intravenös (RADVANY, NEALE und NOWOTNY, 1966) - verabfolgt wird und nach einer definierten Beobachtungszeit die LD_{50} bestimmt wird. Die Arbeitsgruppe um RIBI (RIBI, MILNER und PERRINE, 1959; LARSON et al., 1960; HASKINS et al., 1961) benutzte für diesen Zweck 21 Tage alte Mäuse, während die Arbeitsgruppe um NOWOTNY (RADVANY, NEALE und NOWOTNY, 1966; CUNDY und NOWOTNY, 1968) 18 bis 20 g schwere Mäuse einsetzte. Die abschließende Auswertung erfolgte 6 Tage nach Injektion (RIBI) - wobei bei den ab viertem Tag gestorbenen Mäusen eine Infektion ausgeschlossen wurde - bzw. 12 - 72 Stunden nach Injektion (NOWOTNY). Nach NOWOTNY (1971) beträgt die LD_{50} einer üblichen Endotoxinzubereitung 200 - 400 μ g/Maus. Vorteile dieser Methode gegenüber dem Pyrogennachweis mit dem Kaninchentest sind nach SULZER (1971) der geringere Kostenaufwand, die ständige Verfügbarkeit von Mäusen und der lineare Zusammenhang zwischen verabfolgter Dosis und Letalitätseffekt. Nachteilig wirkt sich bei diesem reproduzierbare Resultate erbringenden Test allerdings aus, daß die native Resistenz der Mäuse relativ groß ist (LARSON et al., 1960). Nach BERRY (1966) spielt auch die Raumtemperatur, bei der die Mäuse vor und während der LD_{50} -Bestimmung gehalten werden, eine beträchtliche Rolle hinsichtlich ihrer Endotoxinempfindlichkeit.

2.2.3. Hühnerembryo-Letalitätstest

Der CE (chick embryo)-Letalitätstest wurde 1956 von SMITH und THOMAS erstmals beschrieben. Er beruht darauf, daß auf die Chorioallantois-membran zehn Tage bei 38°C bebrüteter Eier Endotoxin verbracht wird. Nach einer weiteren Inkubation von 18 - 24 Stunden wird die Anzahl toter Embryonen registriert. Die LD₅₀ wurde mit 200 - 300 mcg E. coli Endotoxin pro kg Körpergewicht angegeben. Die Autoren verwiesen darauf, daß der CE-Letalitätstest von verschiedenen Faktoren erheblich beeinflußt werden kann. So dürfen z.B. nicht wesentlich ältere bzw. jüngere Embryonen verwendet werden oder die Embryonen nach der Inokulation des Endotoxins nicht bei Temperaturen unter 38°C bzw. über 39,5°C bebrütet werden, da anderenfalls die Sensitivität dieses Verfahrens erheblich herabgesetzt würde.

Nachdem schon SMITH und THOMAS 1956 darauf hingewiesen hatten, daß bei intravasaler Beimpfung des Hühnerembryos die LD₅₀-Werte ungefähr 10fach niedriger waren als bei Beimpfung der Chorioallantoismembran und somit eine höhere Empfindlichkeit erzielt werden konnte, wählte FINKELSTEIN (1964) diese Injektionsroute. Außerdem bevorzugte er 11 Tage alte Embryos für die Versuche, da diese das Trauma der intravasalen Beimpfung leichter überstanden, ohne dabei eine geringere Empfindlichkeit zu zeigen. Dieser Autor bestätigte die gute Eignung des CE-Letalitätstests zum Endotoxinnachweis und nannte als weitere Vorteile dieser Methode, daß Hühnerembryonen fast immer zur Verfügung ständen, auch in großer Anzahl in die Versuche einbezogen werden könnten und als keimfrei anzusehen seien. Nachteilig ist, daß die Beimpfung des Hühnereies erfahrenes Personal erfordert, da anderenfalls das Absterben des Embryos durch die nicht fachgerechte Injektion bedingt sein kann und nicht durch die zu testende Substanz. MILNER und FINKELSTEIN (1966) verglichen den CE-Letalitätstest und den oben beschriebenen Pyrogennachweis mit dem Kaninchentest miteinander und stellten fest, daß beide Verfahren gleichwertig waren.

2.2.4. Limulus-Test

Der Test wurde nach dem Spender des für den Endotoxinnachweis verwendeten Reagenz, dem amerikanischen Pfeilschwanzkrebs - *Limulus polyphemus* - benannt. Der auch als Hufeisenkrabbe bezeichnete Pfeilschwanzkrebs gehört zusammen mit dem Molukkenkrebs zur Ordnung der Schwertschwänze als eine Art "lebendes Fossil", dessen Verwandte längst ausgestorben sind (FRAUCH, 1974 a). Er ist ein Bindeglied zwischen altfossilen krebsähnlichen Formen (*Gigantostroma*) und den Arachnoiden (RONNEBERGER und STÄRK, 1974). Der Pfeilschwanzkrebs wird bis zu 60 cm lang und ist an der Ostküste der USA - insbesondere am südlichen Teil der Atlantikküste und an der Küste am Golf von Mexiko - anzutreffen. Die Tiere leben entweder im Küstensand oder -schlamm, wo sie sich laufend oder grabend fortbewegen, oder sie schwimmen in Rückenlage in den Küstengewässern. Als Nahrung dienen ihnen Muscheln, kleine Fische und Krebse (FRAUCH, 1974 a).

Von Bedeutung für die Entwicklung des Limulus-Tests von BANG (1956) war die Beobachtung, daß es beim *Limulus* nach natürlichen Infektionen durch gramnegative Keime der Spezies *Vibrio* (SHIRODKAR, WARWICK und BANG, 1960) zu einer generalisierten intravaskulären Koagulation kam. In ergänzenden Versuchen (in vivo) wurde anschließend festgestellt, daß nicht nur die vermehrungsfähigen Keime, sondern auch Filtrate 10 Minuten gekochter Keimsuspensionen ("Toxine") tödlich wirkten. Der gleiche Effekt wurde durch *Shigella*-Toxin ausgelöst, während Keimsuspensionen von Pneumokokken, Staphylokokken bzw. Streptokokken ohne negative Wirkung blieben. Auffälligerweise waren bei erwachsenen Pfeilschwanzkrebsen tödliche intravasale Koagulationen bei weitaus geringeren "Toxin"-Mengen zu registrieren als bei jungen Tieren.

In vitro kam es zu einer der intravasalen Koagulation vergleichbaren Gelbildung, wenn vermehrungsfähige Keime o.a. Spezies bzw. deren "Toxin" dem Pfeilschwanzkrebsen entnommenen Blut zugesetzt wurden (BANG, 1956). Für diese Reaktion sind offensichtlich die zellulären Bestandteile des

Limulusulutes, die sog. Amöbozyten, von entscheidender Bedeutung, da bei Verwendung von amöbozytenfreiem Limulus-Blutplasma Endotoxin selbst nach einwöchiger Einwirkung keine Gelbildung bewirkte (LEVIN und BANG, 1964). Dieses Vermögen war auf die Amöbozyten selbst bzw. auf den auch als "Pre-Gel", "koagulierbares Protein" oder "Coagulogen" (SOLUM, 1973) bezeichneten klaren, zellfreien Überstand beschränkt, der sich bildete, wenn Limulusblut nach der Entnahme längere Zeit stehengelassen wurde. Weitere Untersuchungen ergaben, daß größere Mengen an "koagulierbarem Protein" nachweisbar waren, wenn Limulusblut vor dem Stehenlassen kurz geschüttelt wurde oder die Amöbozyten anderweitig zertrümmert ("lysiert") wurden. Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, daß die Desintegration der Amöbozyten entweder zur Freisetzung von "koagulierbarem Protein" führt oder einen Faktor freisetzt, der aus einer im Plasma bereits vorhandenen Substanz das "koagulierbare Protein" bildet, oder ein "Pro-Koagulant" freisetzt, das durch Endotoxin aktiviert wird. Später berichteten LEVIN (1967) sowie LEVIN und BANG (1968), daß für die Gelbildung bei Endotoxineinwirkung kein aus dem Plasma stammender Faktor verantwortlich sei. Es wurde vielmehr die Ansicht vertreten, daß Endotoxin ein Enzym aktiviere, welches wiederum direkt mit dem "koagulierbaren Protein" reagiere. Diese Theorie wurde aufgrund umfangreicher Untersuchungen von SOLUM (1970; 1973), YOUNG, LEVIN und PRENDERGAST (1972) sowie YIN (1975) bestätigt. Nach YOUNG, LEVIN und PRENDERGAST besteht Amöbozytenlysate aus drei Fraktionen: der hitzelabilen Fraktion I, die durch Endotoxin aktiviert wurde und mit der hitzestabilen Fraktion II ("clottable protein") die Gelbildung bewirkte, während der Fraktion III offenbar keine Bedeutung zukam. Durch auf die Fraktion I einwirkende Enzyminhibitoren wie Di-isopropylfluorophosphat, Para-chloromercuribenzoat, Para-chloromercuriphenylsulfonat konnte die Reaktion zwischen Amöbozytenlysate und Endotoxin blockiert werden. Ähnliches berichtete auch YIN (1975), der allerdings nur zwei Fraktionen darstellen konnte, die Fraktion E mit dem Endotoxin-sensitiven "Proenzym" und die Fraktion G mit dem "Precursor-Gel". Einzelheiten über Beschaffenheit und Struktur des "clottable protein" bzw. des "Enzyms" können den Publikationen von HOLME und SOLUM (1973) bzw. SULLIVAN und WATSON (1975 b) entnommen werden.

Zur Herstellung des für den Endotoxinnachweis eingesetzten Amöbozyten-lysats gewinnt man von ausgewachsenen Pfeilschwanzkrebsen durch Herzpunktion (Einstichstelle: am Gelenk zwischen thorakalen und abdominalen Segmenten) bis zu 200 ml (REINHOLD und FINE, 1971; COOPER, HOCHSTEIN und SELIGMANN, 1972; MARTINEZ-G, QUINTILIANI und TILTON, 1973) des aufgrund des Hämocyanin-Gehaltes blauen Blutes (BANG, 1956). Nach HOCHSTEIN et al. (1973) bestehen dabei insofern Unterschiede, als von Pfeilschwanzkrebsen, die an der Küste gefangen werden, zwar mehr Blut genommen werden kann als von Pfeilschwanzkrebsen aus dem Meer, das Blut aber deutlich zellärmer ist. Die Blutentnahme überleben etwa 5% der Pfeilschwanzkrebse nicht (COOPER, HOCHSTEIN und SELIGMANN, 1972), von den übrigen kann nach etwa 2 Monaten erneut Blut abgenommen werden (JONES, ROE und DYSTER, 1975). Das Blut wird sogleich mit N-Äthylmaleimid (NEM) versetzt, das nicht nur eine Aggregation der Amöbozyten verhindert (BRYAN et al., 1964), sondern auch die Zellmembran der Amöbozyten im Hinblick auf den später erfolgenden Waschprozeß stabilisiert (REINHOLD und FINE, 1971; HOCHSTEIN et al., 1973). Die Amöbozyten werden nach Abtrennung von der blauen Hämolymphe und wiederholtem Waschen, z.B. mit synthetischem gepufferten Meerwasser (LEVIN und BANG, 1966 und 1968; ROJAS-CORONA et al., 1969), Natriumchloridlösung (SOLUM, 1970; REINHOLD und FINE, 1971; HOCHSTEIN et al., 1973; JORGENSEN und SMITH, 1973 a) oder Trispuffer mit Calciumchlorid und Natriumchlorid (YIN et al., 1972) lysiert. Dies erfolgt zumeist durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen (LEVIN und BANG, 1966 und 1968; SOLUM, 1970; HOCHSTEIN et al., 1973; JONES, ROE und DYSTER, 1975) oder durch Einwirkung destillierten Wassers (ROJAS-CORONA et al., 1969; REINHOLD und FINE, 1971; YOUNG, LEVIN und PRENDERGAST, 1972; HOCHSTEIN et al., 1973; JORGENSEN und SMITH, 1973 a; MARTINEZ-G, QUINTILIANI und TILTON, 1973). Um die Desintegration der Amöbozyten zu verbessern, wurden von einigen Untersuchern zusätzlich Homogenisier- bzw. Mixgeräte eingesetzt (WARD und HILL, 1972; YIN et al., 1972; HOCHSTEIN et al., 1973; JORGENSEN und SMITH, 1973 a). Vergleichende Untersuchungen der verschiedenen Methoden zur Lysis der

Amöbozyten ergaben, daß die Sensitivität des Lysats am besten war, wenn die Amöbozyten mit Tris-Puffer versetzt wurden und im Homogenisiergerät oder Mixer gut homogenisiert wurden. Die Methoden des Aufbrechens der Amöbozyten mittels Aqua dest. bzw. durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen erwiesen sich als weniger effektiv (HOCHSTEIN et al., 1973). Der sich bei anschließendem Zentrifugieren bildende klare Überstand wird dann gewonnen und dient als sog. Amöbozytenlysat zur Durchführung des eigentlichen Limulustests. Das Amöbozytenlysat wird zumeist im Kühlschrank (bei 4°C) aufbewahrt. Dabei soll z.B. nach 5 Monaten (LEVIN, TOMASULO und OSER, 1970), 8 Monaten (MARTINEZ-G, QUINTILIANI und TILTON, 1973), 9 Monaten (COOPER, LEVIN und WAGNER, 1971; COOPER, HOCHSTEIN und SELIGMANN, 1972) bzw. sogar nach 10 Monaten (LEVIN et al., 1970) noch kein Aktivitätsverlust feststellbar gewesen sein. Wenn das Amöbozytenlysat nach der Gewinnung eingefroren wird, soll es seine Aktivität nahezu unbegrenzt (REINHOLD und FINE, 1971) bzw. mindestens ein Jahr (WARD und HILL, 1972; SULLIVAN und WATSON, 1974) behalten. Auch gefriergetrocknetes Amöbozytenlysat konnte nach Angaben von HOCHSTEIN et al. (1973) sowie SULLIVAN und WATSON (1974) über ein Jahr ohne Aktivitätsverlust bei Temperaturen von nicht mehr als 4°C gelagert werden, während es bei Zimmertemperatur bereits nach einem Monat erheblich an Aktivität verlor (COOPER, HOCHSTEIN und SELIGMANN, 1972; HOCHSTEIN et al., 1973). Allerdings wird die Aktivität des flüssigen Amöbozytenlysats durch den Prozeß der Gefriertrocknung vermindert (MARCUS, 1975).

Der Limulus-Test selbst wird im allgemeinen als Röhrchentest so durchgeführt, daß in kleine Reagenzröhrchen (z.B. 10 x 75 mm) gleiche Mengen - zumeist 0,1 ml, zwecks Einsparung von Reagenz und Material aber auch nur 0,075 ml (LEVIN et al., 1970 und 1972; YOUNG, LEVIN und PRENDERGAST, 1972), 0,05 ml (BUTLER et al., 1976) oder sogar nur 0,03 ml (NACHUM, LIPSEY und SIEGEL, 1973) - Probe und Amöbozytenlysat vermischt werden. Offenbar recht selten sind bisher zwei von Schweizer Forschern beschriebene modifizierte Mikromethoden, der Objektträger-Test (FRAUCH, 1974 b; BEUSS et al., 1976) bzw. der Deckgläschen-Test (NGUYEN und GREPPIN, 1974; BEUSS et al., 1976) eingesetzt worden.

Die beim Limulus-Test ablaufende Reaktion zwischen Amöbozytenlysat und Endotoxin ist temperatur- und pH-abhängig. Sie soll bei 37°C schneller ablaufen als bei anderen Temperaturen im Bereich von 4 bis 40°C (LEVIN, TOMASULO und OSER, 1970; REINHOLD und FINE, 1971; YOUNG, LEVIN und PRENDERGAST, 1972) und ist am stärksten ausgeprägt im neutralen bis leicht alkalischen Bereich. Nach LEVIN, TOMASULO und OSER (1970) ist die Reaktion bei pH-Werten von 6,8 bis 7,5 optimal, bei pH 6,2 bzw. 8,2 bereits etwas schwächer, bei pH 5,9 merklich schlechter und bei pH 5,3 gar nicht mehr nachweisbar. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch YOUNG, LEVIN und PRENDERGAST (1972), die berichteten, daß die bei pH 7,5 optimale Reaktion bei pH 5,7 bzw. pH 8,6 nur noch schwach sei. REINHOLD und FINE (1971) beobachteten dagegen im pH-Bereich von 5,5 bis 7,5 optimale Reaktionen zwischen Amöbozytenlysat und Endotoxin. Aufgrund des Einflusses von pH-Wert und Bebrütungstemperatur werden die zu untersuchenden Proben - sofern sie nicht bereits einen für den Reaktionsablauf geeigneten pH-Wert aufweisen - mit NaOH bzw. HCl eingestellt und nach Vermischung mit dem Lysat im allgemeinen bei 37°C bebrütet. Der Test wird durchwegs nach einer Stunde abgelesen, vereinzelt jedoch auch nach insgesamt 4 und 24 Stunden, sofern es nach 60 Minuten noch nicht zur Bildung eines festen Gels gekommen war. Einige Untersucher beurteilen dabei den Test innerhalb der ersten Stunde in Abständen von 5 bis 15 Minuten und dann in größeren Zeitabständen, um auf diese Art und Weise eine gewisse Aussage über den Endotoxingehalt machen zu können (LEVIN, TOMASULO und OSER, 1970; YOUNG, LEVIN und PRENDERGAST, 1972). Bei den wiederholten Ablesungen muß allerdings vermieden werden, daß das Röhrchen geschüttelt wird, da sonst die Gelbildung infolge mechanischer Zerstörung verhindert wird (LEVIN und BANG, 1964) oder das gebildete Gel irreversibel gestört und wieder verflüssigt werden kann (EIBERT, 1972; FRAUCH, 1974 a). Vereinzelt wird auch 4 bis 6 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend bis zu 24 Stunden bei Zimmertemperatur (LEVIN et al., 1970 und 1972; COOPER, LEVIN und WAGNER, 1971; NACHUM, LIPSEY und SIEGEL, 1973). Länger als 24 Stunden wird jedoch im allgemeinen nicht bebrütet,

da dann eine Reaktion zwischen Endotoxin und Amöbozytenlysats auszuschließen ist (LEVIN, TOMASULO und OSER, 1970; LEVIN et al., 1970 und 1972), nicht aber eine wärmebedingte unspezifische Gelbildung (DAS und FOLKMAN, 1975).

Von der Mehrzahl der Untersucher wurden nur solche Proben als positiv beurteilt, die innerhalb des Beobachtungszeitraumes ein festes Gel gebildet hatten, das auch beim Umkippen des Röhrchens um 180° fest am Boden haftete und nicht herausglitt. Andere Untersucher neigten die Röhrchen nur um einen Winkel von 45° (ROJAS-CORONA et al., 1969; EIBERT, 1972; YIN et al., 1972; RONNEBERGER und STÄRK, 1974), doch sind hierbei falschpositive Ergebnisse aufgrund der Oberflächenspannung des Testgemisches nicht auszuschließen (HOCHSTEIN et al., 1973). Schließlich wurden auch Proben als positiv bezeichnet, die nur eine Zunahme der Viskosität und Trübung des Testgemisches oder die Bildung stärkeartiger, am Röhrchen haftender Körnchen bewirkten (LEVIN und BANG, 1964 und 1968; LEVIN, TOMASULO und OSER, 1970; LEVIN et al., 1970 und 1972; EIBERT, 1972; JORGENSEN und SMITH, 1973 a; NACHUM, LIPSEY und SIEGEL, 1973; WILDFEUER et al., 1974; ELIN et al., 1975; JONES, ROE und DYSTER, 1975; u.a.). Es ist aber nicht nur auf die unterschiedliche Art der Durchführung und Auswertung des Limulus-Tests zurückzuführen, daß die Angaben zur Sensitivität des Limulus-Tests zum Teil erheblich differieren - 1 pg/ml (YIN et al., 1972) einerseits, 1 bis 10 ng/ml andererseits (ELIN et al., 1975; SULLIVAN und WATSON, 1975 b). Vergleichende Untersuchungen haben nämlich gezeigt, daß auch die Empfindlichkeit des Amöbozytenlysats gegenüber dem Endotoxin schwanken kann (COOPER, HOCHSTEIN und SELIGMANN, 1972; LINDBERG et al., 1972; WARD und HILL, 1972; JORGENSEN und SMITH, 1973 a; SULLIVAN und WATSON, 1974; ELIN et al., 1975). Dabei spielen offensichtlich individuelle Unterschiede bei den einzelnen Spendern (LINDBERG et al., 1972), jahreszeitliche Schwankungen der Art, daß die "Sommerlysate" sensitiver sind als die "Winterlysate" (LINDBERG et al., 1972; JORGENSEN und SMITH, 1973 a; SULLIVAN und WATSON, 1974) wie auch Unterschiede bei der Herstellung des Lysats (siehe oben) eine Rolle. Dies wird auch aus der einer Publikation von ELIN et al. (1975) vom National Institute of Health (NIH) entnommenen Übersicht deutlich.

Übersicht 1: Vergleich verschiedener Limulus-Amöbozytenlysate
(nach ELIN et al., 1975)

Herkunft des Lysats	Sensitivität (ng Endotoxin/ml)*)
NIH Charge 1	1 nach 4 Std.
NIH Charge 2	1 nach 24 Std.
Dr. Fine	10 nach 4 Std.
Dr. Levin	1 nach 4 Std.
Dr. Yin	10 nach 4 Std.
Mallinckrodt Chemical Works	10 nach 4 Std.
Woods Hole Laboratory	10 nach 24 Std.

*) Geringste Menge eines Klebsiella-Endotoxins, die nach 1, 4 bzw. 24 Stunden Gelbildung bewirkte.

Während WARD und HILL (1972) noch die Ansicht vertraten, daß der Einfluß der Lysatherstellung auf die Sensitivität des Amöbozytenlysats nur dadurch bedingt sei, daß die "Lyse" der Amöbozyten unvollständig sei und deren Menge von Charge zu Charge häufig differiere, sind diese Schwankungen nach SULLIVAN und WATSON (1974) auch bei mechanischer Zerkümmerung der Amöbozyten und gleicher Ausgangsmenge nicht auszuschalten. Letztgenannte Autoren gehen vielmehr davon aus, daß das Amöbozytenlysat einen Inhibitor enthält, der mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln - am besten Chloroform - weitgehend entfernt werden kann. Die Lysate wiesen jedoch noch selbst nach Chloroformextraktion und einem zur Sensitivitätssteigerung erfolgenden Zusatz divalenter Kationen (z.B. Ca^{++} , Mg^{++} oder Mn^{++}) gewisse saisonale Schwankungen auf. Schließlich ist bei den Angaben zur Sensitivität des Limulus-Tests zu bedenken, daß oft Endotoxine verschiedener Herkunft verwendet werden und nicht ein standardisiertes Produkt. So berichteten COOPER, LEVIN und WAGNER (1971) sowie COOPER, HOCHSTEIN und SELIGMANN (1972), daß das von ihnen verwendete Klebsiella-Endotoxin der Food and Drug Administration (SELZER, 1970) potenter war als ein parallel mitlaufendes E. coli-Endotoxin (0127:88) der Firma Difco. Dabei dürften die Unterschiede jedoch weniger durch die Art des Endotoxinbildners als vielmehr durch den unterschiedlichen Reinheitsgrad bzw. das unterschiedliche Extraktionsverfahren bedingt gewesen sein.

Untersuchungen zur Spezifität des Limulus-Tests deuten darauf hin, daß dieser spezifisch für gramnegative Keime bzw. deren Endotoxine ist. Erfaßt werden "zellgebundenes" Endotoxin der Keime selbst sowie gelöstes oder "freies" Endotoxin (JORGENSEN und SMITH, 1972; STUMACHER, KOVNAT und MCCABE, 1973), wobei in der Aktivität keinerlei Unterschiede bestehen (JORGENSEN und SMITH, 1974). "Freies" Endotoxin wurde nach Angaben von CRUTCHLEY, MARSH und CAMERON (1967 und 1968) nur bei günstigen Wachstumsbedingungen (z.B. bei stärkerer Belüftung des Mediums) in größeren Mengen an das Medium abgegeben, und zwar vermutlich aufgrund einer Überproduktion von Endotoxin während des Wachstums der Keime, nicht aber aufgrund einer Lysis der Keime. Bei statischen Kulturen waren demgegenüber

nur geringe Mengen freien Endotoxins nachzuweisen. JORGENSEN und SMITH (1974) konnten jedoch feststellen, daß auch bei weniger günstigen Wachstumsbedingungen größere Mengen freien Endotoxins im Medium vorhanden waren und daß die Menge freien Endotoxins sogar dann zunahm, wenn sich die Keime nicht vermehrten. Sie führten dies auf eine erhöhte Löslichkeit des Endotoxins "ruhender" Bakterienzellen bzw. vermehrte Endotoxinabgabe an das Medium zurück, nicht aber auf eine Überproduktion.

Da auch nach Freisetzung von Endotoxin "gebundenes" Endotoxin an der Zelloberfläche der Keime verbleibt, diskutierten JORGENSEN und SMITH (1974) auch die Möglichkeit, anhand einer quantitativen Bestimmung des gebundenen Endotoxins (Gesamtextoxin abzüglich "freies" Endotoxin, das nach Abtrennung der Keime im Filtrat nachgewiesen wird) den ungefähren Gehalt an gramnegativen Keimen zu ermitteln. Basis für diese Überlegung war die Beobachtung (JORGENSEN et al., 1973), daß in Modellversuchen eine lineare Beziehung zwischen Reaktionsausfall des Limulus-Tests und Anzahl gewaschener und im Harn resuspendierter vermehrungsfähiger Keime von *E. coli* bzw. *K. pneumoniae* bestand: Ein positiver Limulus-Test nur im unverdünnten Harn war mit dem Nachweis von 1000 Keimen/ml verbunden, ein positiver Limulus-Test noch im 1:1000 verdünnten Harn mit dem Nachweis von 1 000 000 Keimen/ml. Nach STUMACHER, KOVNAT und McCABE (1973) erbrachten allerdings auch schon 1 bis 5×10^2 Keime/ml Kochsalzlösung ein positives Resultat im Limulus-Test.

Bei Reinkulturen der in folgender Übersicht aufgeführten grampositiven Mikroorganismen und Hefen wurden ebensowenig positive Resultate im Limulus-Test erzielt wie mit Extrakten von *Gaffkya tetragenes* (LEVIN und BANG, 1964), aktiviertem Streptolysin, Streptodornase, Streptokinase oder Tetanustoxin (REINHOLD und FINE, 1971) bzw. Botulinum-Toxin oder Aflatoxin (MALLINCKRODT, 1974). Zwar bewirkten aus der Zellwand einiger grampositiver Keime (Streptokokken, Mikrokokken, Staphylokokken) extrahierte Peptidoglycane, die endotoxinähnliche Eigenschaften aufweisen, in Modellversuchen ebenfalls eine Gelbildung des Amöbozytenlysats, doch sind die für einen positiven Test erforderlichen Peptido-

Übersicht 2: Im Limulus-Test negativ reagierende Reinkulturen
grampositiver Keime bzw. Hefen

Mikroorganismus	Autor
Diplococcus pneumoniae	BANG (1956), REINHOLD und FINE (1971)
Staphylococcus aureus	BANG (1956), REINHOLD und FINE (1971) WILDFEUER et al. (1974, 1975)
Staphylococcus epidermis	WILDFEUER et al. (1974, 1975)
Micrococcus lysodeikticus	WILDFEUER et al. (1974, 1975)
Streptococcus haemolyticus	REINHOLD und FINE (1971)
Streptococcus serolog. Gr. A	WILDFEUER et al. (1974, 1975)
Streptococcus serolog. Gr. B	WILDFEUER et al. (1975)
Streptococcus serolog. Gr. D	
Candida albicans	JORGENSEN und SMITH (1973 a), WILDFEUER et al. (1975)
Candida tropicalis Candida guilliermondii Candida stellatoidea Candida krusei Candida parapsilosis Cryptococcus neoformans Cryptococcus sp. Torulopsis glabrata Rhodotorula sp. Saccharomyces cerevisiae	JORGENSEN und SMITH (1973 a)

glycan-Konzentrationen, die 1000 bis 400 000fach höher sind als jene von E. coli-Lipopolysacchariden, normalerweise kaum zu erwarten (WILDFEUER et al., 1974 und 1975).

Blut, Blutplasma, vasoaktive Substanzen wie Serotonin, Histamin, Epinephrin, Norepinephrin und Bradykinin, sowie Calcium oder Hämoglobin bewirkten in den im Blut vorkommenden Konzentrationen ebenfalls keine unspezifische Gelbildung (ROJAS-CORONA et al., 1969; REINHOLD und FINE, 1971). Bei Thrombin wurde zwar im Gegensatz zu den Angaben von REINHOLD und FINE (1971) von einigen Autoren (SOLUM, 1970; ELIN und WOLFF, 1973; YIN, 1975) eine positive Reaktion registriert, doch dürfte diese nach Ansicht von SOLUM (1970) sowie YIN (1975) auf eine Kontamination des Thrombins mit Endotoxin zurückzuführen sein, nicht aber auf eine Eigenwirkung des Thrombins. Eine Fehlinterpretation des Limulus-Tests (falsch-positiv) bei Untersuchung pyrogen wirksamer Polynukleotide, wie Poly(I) . poly(C), kann durch Zusatz der diese Verbindungen inaktivierenden Ribonuklease vermieden werden (ELIN und WOLFF, 1973).

Von größerer Bedeutung ist die Tatsache, daß der Limulus-Test durch das Untersuchungsmaterial selbst derart beeinflußt werden kann, daß die nachgewiesenen Endotoxinkonzentrationen deutlich unter den tatsächlich vorhandenen liegen. So ist bei der Untersuchung von Blutproben eine Vorbehandlung unerläßlich, da im Blut offensichtlich eine Substanz vorhanden ist, die das Endotoxin teilweise inaktiviert oder mit der Reaktion selbst interferiert (LEVIN, TOMASULO und OSER, 1970). Zur Elimination dieses Faktors wurden vier verschiedene Verfahren vorgeschlagen: Chloroformextraktion (LEVIN, TOMASULO und OSER, 1970), Verdünnung des Blutplasmas mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1 bis 10% (LEVIN, TOMASULO und OSER, 1970), pH-Veränderung (REINHOLD und FINE, 1971), pH-Veränderung und Verdünnung (MORAVEK et al., 1974). Hinsichtlich der Einwirkungszeit des Chloroforms (1 Teil) auf das Blutplasma (4 Teile) bestehen unterschiedliche Vorstellungen: Während LEVIN, TOMASULO und OSER (1970) noch eine Stunde für ausreichend erachteten, berichteten LEVIN et al. (1970 und 1972), daß 4 Stunden Einwirkungszeit eine bessere "recovery" erbrachten.

STUMACHER, KOVNAT und McCABE (1973) fanden dagegen keinen durch die Einwirkungszeit bedingten Unterschied. REINHOLD und FINE (1971) sowie MARTINEZ-G, QUINTILIANI und TILTON (1973) beurteilten die Chloroformextraktion als zu zeitaufwendig und bevorzugten - nicht zuletzt auch aufgrund der besseren Wiedergewinnungsrate - die Methode der pH-Veränderung. Dabei wird das Blutplasma mit Eisessig zuerst auf pH 4,0 gesenkt und anschließend mit Dikaliumphosphatpuffer (pH 9,4) auf pH 6,2 eingestellt. Auch MORAVEK et al. (1974) hielten die Methode der pH-Veränderung für besser als die Chloroformextraktion oder die Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung, empfahlen jedoch im Anschluß an die pH-Veränderung noch eine zehnfache Verdünnung vorzunehmen, um somit die Aktivitätshemmung des Endotoxins weitgehend zu eliminieren.

Nach HARTMAN, ZIV und SARAN (1976) ist auch bei der Untersuchung von Milch insbesondere dann, wenn die Milch infolge einer Mastitis sinnfällig verändert ist, eine Chloroformextraktion erforderlich. In den beiden zuvor erschienenen Publikationen zum Nachweis von Endotoxinen in Milch mittels Limulus-Test (DiLUZIO und FRIEDMANN, 1973; TERPLAN, ZAADHOF und BUCHHOLZ-BERCHTOLD, 1975) finden sich demgegenüber keine Hinweise auf die Notwendigkeit dieses Extraktionsschrittes. Dies scheint auch bei der Untersuchung von Hackfleisch (JAY, 1974), Liquor (NACHUM, LIPSEY und SIEGEL, 1973; TRIPPODO, JORGENSEN und PRIANO, 1973; ROSS et al., 1975; BUTLER et al., 1976), Harn (JORGENSEN et al., 1973; JORGENSEN und JONES, 1975), Injektionsflüssigkeiten (COOPER, LEVIN und WAGNER, 1971; EIBERT, 1972; COOPER, HOCHSTEIN und SELIGMANN, 1972; JORGENSEN und SMITH, 1973 b; FRAUCH, 1974 a; RONNEBERGER und STÄRK, 1974; KRÜGER, ZIMMERMANN und HEBOLD, 1975; MOODY, TROUSDALE und JORGENSEN, 1975; BEUSS et al., 1976), Wasser und Abwasser (DiLUZIO und FRIEDMANN, 1973; JORGENSEN, LEE und PAHREN, 1976) sowie Bier, Wein und Cola-Getränken (DiLUZIO und FRIEDMANN, 1973) nicht erforderlich.

3. Eigene Untersuchungen

Die eigenen Untersuchungen wurden in zwei Hauptabschnitte untergliedert. Im ersten Teil wurde der erstmals von LEVIN und BANG (1964 und 1968) beschriebene Limulus-Test auf seine Eignung zum Nachweis von Endotoxinen gramnegativer Keime unter verschiedenen Bedingungen geprüft. Im zweiten Teil wurde getestet, ob dieses Verfahren auch zum Nachweis von Endotoxinen in roher und erhitzter Milch herangezogen werden kann und somit eine Aussage über den jeweiligen hygienischen Status ermöglicht.

3.1. Material und Methodik

3.1.1. Reaktion von Reinkulturen gramnegativer und grampositiver Bakterien sowie Hefen im Limulus-Test

Für diese Untersuchungen standen Reinkulturen verschiedener aus Lebensmitteln isolierter Keime der Gattungen *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus* bzw. *Erwinia* (jeweils gramnegativ), *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* bzw. *Lactobacillus* (jeweils grampositiv) sowie Reinkulturen zweier Hefestämme zur Verfügung. Die Reinkulturen wurden von aus der Sammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch stammenden Schrägagarkulturen (Nähragar, Oxoid) in sterile Hirn-Herz-Bouillon (Oxoid) überimpft und 24 Stunden bei 30°C bebrütet. Nach der Bebrütung wurde der Limulus-Test (3.1.1.1.) mit jeweils 0,1 ml der verschiedenen Bouillonkulturen und deren Verdünnungsstufen 10^{-5} bis 10^{-12} durchgeführt. Außerdem wurde die Gesamtkeimzahl der Bouillonkulturen bestimmt. Hierfür wurde Plate-Count-Agar (Oxoid) bzw. für die Lactobazillen Blutagar verwendet. Die Auswertung erfolgte nach 48stündiger Inkubation bei 30°C bzw. nach 72 Stunden bei 37°C (Lactobazillen).

3.1.1.1. Limulus-Test

Das in lyophilisierter Form aus den USA bezogene^{*)} Amöbozytenlysat wurde vor Durchführung des Tests, auf dessen Wirkungsmechanismus bereits in Abschnitt 2.2.4.(S.10) ausführlich eingegangen wurde, entsprechend der Gebrauchsanweisung mit 5 ml pyrogenfreien Wassers (Braun, Melsungen), das eine Stunde autoklaviert worden war, rekonstituiert. Da der Gummistopfen des Röhrchens, in dem das Amöbozytenlysat geliefert wurde, nicht frei von pyrogenwirksamen Substanzen ist, wurde er nach dem Öffnen des Röhrchens sogleich verworfen. Bei der Rekonstitution wurde außerdem darauf geachtet, daß das Lysat nicht mit dem oberen Teil des Röhrchens in Berührung kam, um somit eine Kontamination mit verbliebenen Pyrogenen vom Stopfen zu vermeiden. Sofern nicht das gesamte Lysat nach 5 - 10minütigem vorsichtigen Schütteln in Lösung ging, wurde es 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert und der klare Überstand in ein pyrogenfreies Röhrchen überführt. (Alle während der Versuche benötigten Glassachen wurden vor Versuchsbeginn durch intensives Spülen mit pyrogenfreiem Wasser und anschließendem Sterilisieren für 4 Stunden bei 180°C pyrogenfrei gemacht.) Je 0,1 ml des rekonstituierten Lysats wurden in 50 Teströhrchen (10 x 75 mm) pipettiert, die 50 Röhrchen mit Parafilm verschlossen und bei -20°C eingefroren. In diesem Zustand ist das Lysat ca. 4 Wochen haltbar, während es in frisch rekonstituiertem Zustand nur einige Stunden stabil ist. Vor dem Ansatz des Limulus-Tests wurde das eingefrorene Lysat langsam bei Zimmertemperatur aufgelöst. Von der zu untersuchenden unverdünnten bzw. in Zehnerstufen verdünnten Flüssigkeit wurden 0,1 ml zu 0,1 ml des in aufgelöster Form vorliegenden Lysats gegeben und vorsichtig miteinander vermischt. Anschließend wurden die Röhrchen im Wasserbad eine Stunde bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit durften die Röhrchen nicht bewegt oder geschüttelt werden, da dadurch die Bildung des Gels irreversibel gestört und damit ein falschnegatives Ergebnis vorgetäuscht werden kann (LEVIN und BANG, 1964). Nach Inkubation wurden die Röhrchen

^{*)} Bezugsquelle: Marine Biological Laboratory, Woods Hole (Mass.),
später Associates of Cape Cod, Woods Hole (Mass.),
P.O.Box 224

vorsichtig aus dem Wasserbad herausgenommen und jedes einzelne langsam um 180° gekippt und auf Bildung eines Gels untersucht. Als positiv wurde der Test bewertet, wenn sich ein festes oder visköses Gel gebildet hatte.

Bei jeder Versuchsreihe wurden eine negative und eine positive Kontrolle mitgeführt. Als negative Kontrolle diente autoklaviertes pyrogenfreies Wasser, die positiven Kontrollen enthielten in pyrogenfreiem Wasser gelöstes *Escherichia coli*-Endotoxin (055:B5; Difco). In Vorversuchen konnte festgestellt werden, daß noch 0,05 ng des erwähnten Endotoxinpräparates/ml nachweisbar waren. (Nach Angaben des Herstellers des Amöbozytenlysats bildet dieses ein festes Gel, wenn es mit 0,06 ng/ml eines *Klebsiella pneumoniae*-Endotoxins der Food and Drug Administration (Washington/USA) vermischt wird bzw. mit 0,02 ng/ml eines *E. coli*-Endotoxins (0 127:B8).) Die Endotoxingebrauchslösung (0,05 ng/ml) wurde täglich frisch aus einer Vorratslösung (100 ng/ml) hergestellt, welche bis zu 3 Wochen bei Kühlschranktemperaturen gelagert wurde.

3.1.2. Keimzahl und Endotoxingehalt während verschiedener Wachstumsphasen gramnegativer Keime

Um zu ermitteln, wie sich Keimzahl und Endotoxingehalt während der verschiedenen Wachstumsphasen gramnegativer Keime verhalten, wurden 1 ml einer 24 Stunden bebrüteten Bouillonkultur von *Escherichia coli* 0149 K91K88 zu 9 ml steriler Hirn-Herz-Bouillon (Oxoid) gegeben und bei 30°C bebrütet. Die Zahl der kolonienbildenden Einheiten und der Endotoxingehalt wurden anfänglich im Abstand von jeweils 60 Minuten, später dann in mehrstündigen Abständen über eine Versuchsdauer von insgesamt 68 Stunden bestimmt. Die Ermittlung der Keimzahl erfolgte im Koch'schen Plattenverfahren mit Plate-Count-Agar (Oxoid), der 48 Stunden bei 30°C inkubiert wurde. Der Endotoxingehalt (positiver Endtiter) wurde im Limulus-Test (3.1.1.1.) erfaßt.

3.1.3. Freisetzung von Endotoxin durch Zerstörung der Zellwand gram-negativer Keime

Da das Endotoxin zum größten Teil in der Zellwand lokalisiert ist und nur unter bestimmten Bedingungen von jungen intakten Zellen an das Medium abgegeben wird (MILNER, RUDBACH und RIBI, 1971), wurde festzustellen versucht, ob und inwieweit die Endotoxinausbeute bei frischen Kulturen durch Zerstörung der Zellwand erhöht und die Beziehung zwischen Endotoxingehalt und Anzahl gramnegativer Keime verbessert werden kann. Zu diesem Zweck wurden verschiedene physikalischen Methoden (Temperatur-, Ultraschall- bzw. Druckbehandlung mit Zellaufbrechbombe) angewendet. Getestet wurden deren Effekte auf Endotoxingehalt und Keimzahl einer Reinkultur von *Escherichia coli* O149:K91:K88 in Hirn-Herz-Bouillon.

Im ersten Versuchsabschnitt wurde geprüft, ob eine Erhitzung der Hirn-Herz-Bouillon-Kulturen auf 65°C für 15 bzw. 30 Minuten oder eine 24stündige Lagerung bei Temperaturen von -20°C geeignet ist, die Bakterienzellen aufzubrechen und Endotoxin freizusetzen. Die Erhitzungsversuche wurden als Reagenzglasversuche im Wasserbad unter genauer Beachtung der Temperaturkonstanz durchgeführt. Nach Ablauf der Erhitzungszeit wurden die Röhrchen sofort in Eiswasser abgekühlt. Geprüft wurde der Einfluß der Erhitzung auf den Endotoxingehalt (Limulus-Test; siehe 3.1.1.1.) und die Keimzahl (Koch'sches Plattenverfahren mit Plate-Count-Agar) bei nichtinkubierten Hirn-Herz-Bouillon-Kulturen von *E. coli* sowie bei 2 bzw. 4 Stunden bei 30°C bebrüteten Kulturen. Als Beimpfungsmaterial diente jeweils eine 24 Stunden bei 30°C bebrütete *E. coli*-Kultur, von der 1 ml zu 9 ml steriler Hirn-Herz-Bouillon gegeben wurden. Zum Einfrieren wurden 24 Stunden bei 30°C bebrütete Hirn-Herz-Bouillonkulturen in einen Gefrierschrank (-20°C) verbracht. Aufgetaut wurden die Proben am folgenden Tag unter fließendem warmen Wasser (ca. 45°C).

Im nächsten Versuchsabschnitt wurden die Bakterienzellen mit Ultraschall behandelt. Der für diese Zwecke eingesetzte SONIFIER-Ultraschall-Desintegrator (Branson; Modell B-12) erzeugt hochfrequente elektrische

Energie, die mittels eines piezoelektrischen Elementes in mechanische Energie umgewandelt wird. Diese mechanischen Schwingungen wiederum werden über ein Titanwerkzeug in die zu beschallende Substanz geleitet. Handelt es sich bei dieser Substanz um eine Flüssigkeit, so entsteht das bisher noch nicht völlig geklärte Phänomen der Kavitation. Durch die Ausbreitung der Ultraschallwellen in der Flüssigkeit werden die darin befindlichen winzigen Gasbläschen wechselweise zusammengepreßt und entlastet. Bei Erreichen einer kritischen, von der Schallfrequenz abhängigen Größe zerplatzen die Bläschen implosionsartig. Entsprechend der Arbeitsanleitung des Geräteherstellers wurden nichtinkubierte sowie 1, 5, 6, 12 bzw. 24 Stunden bei 30°C bebrütete Hirn-Herz-Bouillonkulturen von *E. coli* 0149:K91:K88 (Herstellung: 1 ml einer 24 Stunden bei 30°C bebrüteten Hirn-Herz-Bouillonkultur + 9 ml steriler Hirn-Herz-Bouillon) bei Leistungsstufe 7 unter Zuhilfenahme einer Standard-Mikrospitze 35, 25 bzw. 15 sec lang beschallt. Anschließend wurden Keimzahl (Koch'sches Plattenverfahren mit Plate-Count-Agar) und Endotoxingehalt (Limulus-Test; siehe 3.1.1.1.) bei diesen Proben wie auch den zum Vergleich mitlaufenden nichtbeschallten Proben bestimmt.

Des weiteren wurde die Eignung einer Zellaufbrechbombe (Nr. 4635, Parr Instrument Company, Moline, Ill./USA) zum Aufschließen der Bakterienzellen und zur Freisetzung von Endotoxin geprüft. Diese Methode beruht darauf, daß große Stickstoffmengen unter hohem Druck von den Bakterienzellen absorbiert werden. Wenn dann der Druck nach einer gewissen Einwirkungszeit plötzlich abfällt, entweicht der Stickstoff in Form expandierender Gasbläschen und zerstört dabei die Zellwand der Bakterien. Im einzelnen wurde so vorgegangen, daß jeweils 100 ml nichtinkubierter sowie 2, 4, 6, 10 bzw. 24 Stunden bebrüteter Hirn-Herz-Bouillonkultur von *E. coli* 0149:K91 K88 auf ihren Gehalt an Endotoxinen (Limulus-Test; siehe 3.1.1.1.) und ihre Keimzahl (Koch'sches Plattenverfahren mit Plate-Count-Agar) untersucht wurden, nachdem zuvor unter Druck (90 bar) eingeleiteter Stickstoff 30 Minuten auf die Kulturen eingewirkt hatte. Zum Vergleich wurden diese beiden Parameter auch bei parallel mitlaufenden Bouillonkulturen bestimmt, die nicht der Behandlung in der Zellaufbrechbombe unterworfen worden waren.

3.1.4. Nachweis von Endotoxinen gramnegativer Keime in Milch mittels Limulus-Test

Im zweiten Teil der Untersuchungen wurde zuerst in orientierenden Versuchen geprüft, ob der Limulus-Test (3.1.1.1.) auch für die Untersuchung von Milchproben geeignet ist und ob zur Ausschaltung falschpositiver bzw. falschnegativer Resultate eine Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials erforderlich ist. Rohen wie auch erhitzten Milchproben in verschiedenen Konzentrationen zugesetztes Endotoxin (055:85; Difco) konnte ebenso wie in mit pyrogenfreiem Wasser hergestellten Vergleichsproben bis zu 0,05 ng/ml nachgewiesen werden. Da falschpositive Ergebnisse im Rahmen dieser Versuche ebenfalls nicht beobachtet wurden, wurde auch im weiteren auf eine Vorbehandlung der Milchproben vor Durchführung des Limulus-Tests verzichtet.

Die eigentlichen Untersuchungen an Milchproben lassen sich in zwei Hauptabschnitte untergliedern, eine Status quo-Erhebung zum Vorkommen von Endotoxinen in rohen und erhitzten Milchproben bzw. methodische Versuche zur Freisetzung von Endotoxinen in Milch.

3.1.4.1. Vorkommen von Endotoxinen in roher und erhitzter Milch

29 unter aseptischen Kautelen (DIERNHOFER, 1950) ermolkene Viertelgemelksproben, 166 Anlieferungsmilchproben sowie 39 pasteurisierte Trinkmilchproben des Handels wurden auf ihren Gehalt an Endotoxinen (Limulus-Test; siehe 3.1.1.1.) und coliformen Keimen geprüft. Die Anzahl coliformer Keime wurde entsprechend der vom Internationalen Milchwirtschaftsverband (1966) für die Untersuchung von Rohmilch empfohlenen Methode mit Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Laktose-Agar (Oxoid) bestimmt.

3.1.4.2. Freisetzung von Endotoxin in roher und erhitzter Milch durch Zerstörung der Zellwand gramnegativer Keime

Um festzustellen, ob in Milch ebenso wie in Hirn-Herz-Bouillon mehr Endotoxin mit dem Limulus-Test nachweisbar ist, wenn die Zellwand der gram-

negativen Keime vorher zerstört wird, wurden rohe bzw. erhitzte Milchproben (Anlieferungsmilch bzw. pasteurisierte Trinkmilch) einer Behandlung mit der Zellaufbrechbombe unterworfen. Dabei wurde so vorgegangen, daß jeweils 100 ml nichtinkubierter sowie 12 bzw. 24 Stunden bei 30°C bebrüteter Rohmilch bzw. Trinkmilch auf ihren Gehalt an Endotoxinen (Limulus-Test; siehe 3.1.1.1.) und coliformen Keimen (Koch'sches Plattenverfahren mit Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Laktose-Agar) untersucht wurden, nachdem zuvor unter Druck (90 bar) eingeleiteter Stickstoff 30 Minuten in der Zellaufbrechbombe eingewirkt hatte (analog zu 3.1.3.). Entsprechende Versuche wurden jeweils mit der gleichen Milchprobe durchgeführt, nachdem sie zuvor mit 0,1 ml einer 24 Stunden bei 30°C bebrüteten Hirn-Herz-Bouillonkultur von *E. coli* O 149:K91:K88 beimpft worden war. Zum Vergleich wurden beide Parameter auch in parallel mitlaufenden Rohmilch- sowie Trinkmilchproben bestimmt, die nicht mit der Zellaufbrechbombe bearbeitet worden waren.

In einem abschließenden Versuch wurde an pasteurisierter Trinkmilch geprüft, ob und inwieweit die Zelldisintegration die Ergebnisse bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen (5°C bzw. 25°C) der Milch beeinflußt.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Reaktion von Reinkulturen gramnegativer und grampositiver Bakterien sowie Hefen im Limulus-Test

Der Limulus-Test fiel bei der Untersuchung von 49 jeweils 24 Stunden bei 30°C bebrüteten Reinkulturen verschiedener gramnegativer Bakterien stets positiv aus. (In Tabelle 1 sind die Ergebnisse auszugsweise wiedergegeben.) Die dabei registrierten positiven Endtiter lagen im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-8} , die Keimzahlen reichten von 2,6 bis 140×10^6 /ml. Der negative Exponent des Endotoxintiters entsprach bei der Mehrzahl der getesteten Stämme dem positiven Exponenten der Keimzahl, bei den Spezies *E. coli*, *Kluyvera citrophilia*, *Enterobacter liquefaciens* und *Pseudomonas fragi* wurden jedoch auch Stämme registriert, bei denen der Exponent des Endotoxingehalts um eins größer war als der Exponent der Keimzahl (Tab. 1).

Tabelle 1: Endotoxintiter (Limulus-Test) und Keimzahl verschiedener gramnegativer Bakterien nach 24stündiger Inkubation bei 30°C

Spezies	Endotoxintiter (pos. Endtiter)	Keimzahl in 10 ⁶ /ml
<i>Escherichia coli</i> O149:K91:K88 *)	10 ⁻⁸	140
<i>Escherichia coli</i>	10 ⁻⁸	62
<i>Kluyvera citrophilia</i> 1	10 ⁻⁸	90
<i>Kluyvera citrophilia</i> 2	10 ⁻⁷	60
<i>Citrobacter freundii</i>	10 ⁻⁸	130
<i>Shigella</i> sp.	10 ⁻⁸	140
<i>Klebsiella</i> sp.	10 ⁻⁷	55
<i>Enterobacter cloacae</i>	10 ⁻⁷	12
<i>Enterobacter liquefaciens</i> 6	10 ⁻⁸	84
<i>Enterobacter liquefaciens</i> 21	10 ⁻⁷	48
<i>Hafnia alvei</i>	10 ⁻⁷	72
<i>Serratia marcescens</i>	10 ⁻⁸	140
<i>Proteus vulgaris</i>	10 ⁻⁷	36
<i>Erwinia herbicola</i> 31	10 ⁻⁷	20
<i>Erwinia herbicola</i> 39	10 ⁻⁷	18
<i>Pseudomonas fragi</i> 4	10 ⁻⁷	6,8
<i>Pseudomonas fragi</i> 11	10 ⁻⁶	2,6
<i>Pseudomonas putida</i>	10 ⁻⁶	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 ⁻⁶	2,8
<i>Alcaligenes faecalis</i> 17	10 ⁻⁶	4,2
<i>Alcaligenes faecalis</i> 27	10 ⁻⁶	4

*) freundlicherweise von Dr. G. Baljer, Lehrstuhl für Mikrobiologie und Seuchenlehre, zur Verfügung gestellt.

Im Gegensatz zu den gramnegativen Bakterien reagierten alle getesteten Keime (9) der Gattungen Micrococcus, Staphylococcus, Streptococcus, Bacillus bzw. Lactobacillus trotz Keimzahlen im Bereich von 10^6 bis 10^8 pro ml im Limulus-Test negativ. Auch bei den beiden in die Untersuchungen einbezogenen Hefestämmen wurde ebensowenig ein positives Resultat beobachtet wie bei der stets zur Kontrolle mitlaufenden unbeimpften Hirn-Herz-Bouillon.

3.2.2. Keimzahl und Endotoxingehalt während verschiedener Wachstumsphasen gramnegativer Keime

Die Frage, ob Endotoxingehalt und Keimzahl während der verschiedenen Wachstumsphasen gramnegativer Stäbchen in gleicher oder ähnlicher Weise zunehmen, wurde am Verhalten von Escherichia coli O149:K91:K88 zu studieren versucht. Wie der Tabelle 2 zu entnehmen ist, wurde bis zu 2 Stunden nach der Beimpfung und Inkubation der Hirn-Herz-Bouillon Endotoxin nur bis zur Verdünnung 10^{-3} nachgewiesen, obwohl die Keimzahl bereits bei Versuchsbeginn im Bereich von 10^6 /ml lag. Ähnlich groß waren die Unterschiede auch nach 3- bzw. 4stündiger Inkubation, während sich im weiteren Verlauf eine Annäherung der Exponenten von Keimzahl und Endotoxingehalt abzeichnete. Nach 24stündiger Inkubation waren die Exponenten beider Parameter erstmals gleich groß. Die Keimzahl nahm nach 16 Stunden Bebrütung bis Versuchsende stetig langsam ab, während der Endotoxintiter in keinem Fall niedriger war als bei der zeitlich vorhergehenden Untersuchung.

Tabelle 2: Endotoxingehalt und Keimzahl von E. coli O 149:K91:K88 in
Hirn-Herz-Bouillon nach unterschiedlichen Bebrütungszeiten

Bebrütungszeit in Std. bei 30°C	Endotoxintiter pos. Endtiter	Keimzahl/ml
0	10^{-3}	$1,3 \times 10^6$
1	10^{-3}	$1,5 \times 10^6$
2	10^{-3}	$3,8 \times 10^6$
3	10^{-4}	$1,1 \times 10^7$
4	10^{-4}	$1,1 \times 10^7$
6	10^{-5}	8×10^7
8	10^{-6}	$4,2 \times 10^8$
12	10^{-7}	$4,8 \times 10^8$
16	10^{-7}	5×10^8
22	10^{-7}	$4,4 \times 10^8$
24	10^{-8}	$4,3 \times 10^8$
30	10^{-8}	2×10^8
44	10^{-8}	$1,2 \times 10^8$
68	10^{-8}	$1,0 \times 10^8$

3.2.3. Freisetzung von Endotoxin durch Zerstörung der Zellwand gram- negativer Keime

Von den verschiedenen zur Zerstörung der Zellwand gramnegativer Mikro-
organismen beschriebenen Möglichkeiten wurde die Eignung einiger physika-
lischer Verfahren (Temperatur-, Ultraschall- bzw. Druckbehandlung mittels

Zellaufbrechbombe) zur Freisetzung von Endotoxin bei frischen Kulturen geprüft. Dabei interessierte insbesondere, ob bei den weniger als 6 Stunden inkubierten Kulturen das Endotoxin so stark an die Bakterienzelle gebunden ist, daß der mittels Limulus-Test erfaßte Endotoxintiter trotz hoher Keimzahl relativ niedrig ist.

Bei der zuerst durchgeführten, sich über 15 bzw. 30 Minuten erstreckenden, Erhitzung von frisch überimpften sowie 2 bzw. 4 Stunden inkubierten E. coli 0149:K91:K88-Hirn-Herz-Bouillonkulturen auf 65°C wurden die Keime abgetötet. Der Endotoxintiter stieg dabei im Vergleich zu der nicht erhitzten Kontrolle nicht an (Tabelle 3), so daß der negative Exponent des Endotoxintiters bei allen Proben um mindestens zwei niedriger war als der positive Exponent der Keimzahl/ml.

Tabelle 3: Einfluß einer 15- bzw. 30minütigen Erhitzung auf 65°C auf Endotoxingehalt und Keimzahl von E. coli 0149:K91:K88 in Hirn-Herz-Bouillon

Bebrütungs- zeit (Std.) bei 30°C	Endotoxintiter (pos. Endtiter) auf 65°C erhitzt nicht erhitzt			Keimzahl/ml auf 65°C erhitzt nicht erhitzt		
	15'	30'		15'	30'	
0	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	./.	./.	9,4 × 10 ⁶
2	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	./.	./.	4,6 × 10 ⁷
4	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	./.	./.	6,0 × 10 ⁷

Zeichenerklärung: ./.. = negativ in 1 ml

Durch 24stündiges Einfrieren (bei -20°C) von 24 Stunden inkubierten E. coli 0149 K91 K88-Hirn-Herz-Bouillonkulturen und anschließendem Auftauen unter fließendem warmen Wasser verringerte sich die Keimzahl pro ml nur unwesentlich. Hinsichtlich des Endotoxintiters konnte überhaupt kein Einfluß festgestellt werden.

Nach der mit dem SONIFIER-Ultraschall-Desintegrator (Branson) durchgeführten Beschallung von Hirn-Herz-Bouillonkulturen von E. coli 0149:K91:K88, die unterschiedlich lange bei 30°C bebrütet worden waren, konnten weder vermehrungsfähige Keime noch Endotoxin nachgewiesen werden. Dies war unabhängig von der Beschallungsdauer (15, 25 bzw. 35 Sekunden). Im Gegensatz dazu wurden in den unbeschallten Proben stets sowohl Keime als auch Endotoxin registriert. Dabei wurde wiederum beobachtet, daß die Exponenten von Keimzahl und Endotoxintiter sich anfänglich deutlich unterschieden und erst nach 24stündiger Inkubation übereinstimmten (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Einfluß der Ultrabeschallung auf Endotoxingehalt und Keimzahl von E. coli 0149:K91:K88 in Hirn-Herz-Bouillon

Bebrütungszeit (Std.) bei 30°C	Endotoxintiter (pos. Endtiter)				Keimzahl/ml			
	Beschallung				Beschallung			
	0 sec	15 sec	25 sec	35 sec	0 sec	15 sec	25 sec	35 sec
0	10 ⁻³	./.	./.	./.	9x10 ⁵	./.	./.	./.
1	10 ⁻³	./.	./.	./.	7x10 ⁶	./.	./.	./.
5	10 ⁻⁵	./.	./.	./.	1,1x10 ⁷	./.	./.	./.
6	10 ⁻⁶	./.	./.	./.	7,2x10 ⁸	./.	./.	./.
12	10 ⁻⁷	./.	./.	./.	6,4x10 ⁸	./.	./.	./.
24	10 ⁻⁸	./.	./.	./.	4x10 ⁸	./.	./.	./.

Zeichenerklärung: ./. = negativ in 1 ml

Nach 30minütiger Behandlung einer frisch beimpften sowie 2, 4, 6, 10 bzw. 24 Stunden bebrüteten Hirn-Herz-Bouillonkultur von E. coli 0149:K91:K88 mit der Zellaufbrechbombe wurden keine vermehrungsfähigen Keime mehr nachgewiesen. Der negative Exponent des Endotoxintiters war dagegen bei den frisch beimpften sowie 2, 4, 6 bzw. 10 Stunden bebrüteten Bouillonkulturen nach dem Aufbrechen der Zellen erheblich größer (Tabelle 5) als bei den

Tabelle 5: Einfluß von Zelldesintegration mittels Zellaufbrechbombe auf Endotoxingehalt und Keimzahl von E. coli 0149:K91:K88 nach unterschiedlichen Bebrütungszeiten

Bebrütungs- zeit (Std.) bei 30°C	Endotoxintiter (pos. Endtiter)		Keimzahl/ml	
	mit Zelldesintegration	ohne	mit	ohne
0	10^{-5}	10^{-3}	./.	6×10^5
2	10^{-7}	10^{-4}	./.	2×10^6
4	10^{-7}	10^{-4}	./.	5×10^7
6	10^{-8}	10^{-6}	./.	2×10^8
10	10^{-8}	10^{-6}	./.	6×10^8
24	10^{-8}	10^{-8}	./.	$5,8 \times 10^8$

Zeichenerklärung: ./. = negativ in 1 ml

unbehandelten Kontrollproben - insbesondere bei den 2 bzw. 4 Stunden bebrüteten Kulturen. Bei den 24 Stunden inkubierten Bouillonkulturen konnten hinsichtlich des Endotoxingehaltes allerdings keine Unterschiede mehr zwischen Proben mit bzw. ohne Zelldesintegration festgestellt werden. Auffällig ist, daß der Exponent des Endotoxintiters nach der Desintegration der Zellen mit einer Ausnahme (2 Stunden Inkubation) demjenigen der Keimzahl in den nicht mit der Zellaufbrechbombe behandelten Bouillonkulturen entsprach. Somit war für die weniger als 24 Stunden inkubierten Bouillonkulturen ein besseres Verhältnis zwischen Endotoxingehalt und Keimzahl gegeben als vor der Bearbeitung der Proben mit der Zellaufbrechbombe.

3.2.4. Nachweis von Endotoxinen gramnegativer Keime in Milch mittels Limulus-Test

3.2.4.1. Vorkommen von Endotoxinen in roher und erhitzter Milch

In den 29 unter aseptischen Kautelen ermolkenen Viertelgemelksproben konnten weder Endotoxine (Limulus-Test) noch coliforme Keime (Koch'sches Platten-

verfahren mit Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Laktose-Agar) nachgewiesen werden.

Bei den Anlieferungsmilchproben ergab sich eine enge numerische Beziehung zwischen dem negativen Exponenten des Endtiters beim Limulus-Test und dem positiven Exponenten der Anzahl coliformer Keime/ml (Tabelle 6). So wurden z.B. bei allen 12 Proben, in denen Endotoxin bis zur Verdünnungsstufe 10^{-2} gefunden wurde, Keimzahlen im Bereich von 1×10^2 bis 9×10^2 /ml ermittelt. Entsprechende Beziehungen wurden bei insgesamt 156 der 166 Proben registriert. Bei 5 Proben war der negative Exponent des Endotoxintiters um 1 kleiner als der der Keimzahl/ml, bei den restlichen 5 Proben wurde der umgekehrte Fall beobachtet.

Bei den pasteurisierten Milchproben waren die bei der Anlieferungsmilch festgestellten engen Beziehungen nur bei 7 von 39 Proben gegeben, während bei den restlichen Proben die negativen Exponenten der Endtiter größer waren als die der Keimzahlen/ml. So wurden allein bei 14 Proben, in denen coliforme Keime nicht nachgewiesen werden konnten, Endotoxine noch in den Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-4} festgestellt (Tabelle 7). Der Exponent für die Anzahl coliformer Keime/ml war demgegenüber in keinem Fall größer als der für den positiven Endtiter des Limulus-Tests.

Im Anschluß an diese Untersuchungen wiederholt durchgeführte Stufenkontrollen in einer Molkerei erbrachten keine Unterschiede hinsichtlich des Endotoxintiters der rohen Milch im Vorratstank und der daraus hergestellten pasteurisierten Trinkmilch, die unmittelbar hinter dem Erhitzer entnommen wurde, während coliforme Keime nach der Kurzzeit-Erhitzung nicht mehr nachweisbar waren. Auch im Modellversuch (Dauererhitzung bei 65°C) wurden entsprechende Ergebnisse erzielt.

3.2.4.2. Freisetzung von Endotoxin in roher und erhitzter Milch durch Zerstörung der Zellwand gramnegativer Keime

Nach 30minütiger Behandlung von Anlieferungsmilchproben bzw. pasteurisierten Milchproben in der Zellaufbrechbombe waren vermehrungsfähige Keime mit Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Laktose-Agar nicht mehr nachweisbar (Tabellen 8 und 9). In den nicht derartig behandelten Kontrollproben stieg der Gehalt an Coliformen innerhalb von 12 Stunden bei 30°C jeweils um drei Zehnerpotenzen von 10^2 auf 10^5 /ml (unbeimpfte Anlieferungsmilch) bzw. von 10^1 auf 10^4 /ml (unbeimpfte pasteurisierte Trinkmilch) sowie von 10^6 auf 10^9 /ml (mit Hirn-Herz-Bouillonkultur von E. coli O149 K91 K88 beimpfte Anlieferungsmilch bzw. Trinkmilch). Die Keimzahlen (Coliforme) bei den 24 Stunden bebrüteten Proben entsprachen jenen nach 12 Stunden Inkubation. Endotoxin konnte in allen Milchproben nachgewiesen werden (Tabellen 8 und 9). Während der Endotoxintiter jedoch in den nicht mit E. coli beimpften und nicht mit der Zellaufbrechbombe behandelten Milchproben nur langsam anstieg (von 10^{-2} bei Versuchsbeginn über 10^{-3} auf 10^{-5} nach 24 Stunden Bebrütung bei Anlieferungsmilch bzw. von 10^{-3} über 10^{-4} auf 10^{-6} bei pasteurisierter Milch), war der Höchstwert (ebenfalls 10^{-5} bzw. 10^{-6}) bei den mit der Zellaufbrechbombe behandelten Proben bei gleichen Ausgangswerten bereits nach 12-stündiger Bebrütung erreicht. Bei den weiteren 12 Stunden bei 30°C bebrüteten Proben war somit kein positiver Effekt der Zelldesintegration auf die freigesetzte Endotoxinmenge mehr zu registrieren. Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich des Effektes der Zellaufbrechbombe wurden bei den mit E. coli-Bouillonkulturen beimpften Milchproben (rohe bzw. erhitzte Milch) erzielt.

In einem abschließenden Versuch zum Einfluß der Lagerungstemperatur konnte festgestellt werden, daß Endotoxingehalt und Anzahl coliformer Keime nach 24 Stunden bei 25°C erheblich schneller zugenommen hatten als bei 5°C. Die Zelldesintegration mittels Zellaufbrechbombe blieb jedoch hinsichtlich des nachweisbaren Endotoxingehaltes bei beiden Lagerungstemperaturen ohne positiven Einfluß, ebenso auch bei der als Ausgangsmaterial dienenden Probe (Tabelle 10).

Tabelle 6: Endotoxintiter (Limulus-Test) und Gehalt an coliformen Keimen bei 166 Anlieferungsmilchproben

Limulus-Test (pos. Endtiter)	Anzahl Proben mit Coliformen/ml							
	$10^1 < 10^2$	$10^2 < 10^3$	$10^3 < 10^4$	$10^4 < 10^5$	$10^5 < 10^6$	$10^6 < 10^7$	$10^7 < 10^8$	
1 : 10^1	1	0	0	0	0	0	0	0
1 : 10^2	0	12	0	0	0	0	0	0
1 : 10^3	0	1	14	1	0	0	0	0
1 : 10^4	0	0	1	41	3	0	0	0
1 : 10^5	0	0	0	3	66	0	0	0
1 : 10^6	0	0	0	0	0	22	1	1

Tabelle 7: Endotoxintiter (Limulus-Test) und Gehalt an coliformen Keimen bei 39 Proben pasteurisierter Trinkmilch

Limulus-Test (pos. Endtiter)	Anzahl Proben mit Coliformen/ml						
	0	$1 < 10^1$	$10^1 < 10^2$	$10^2 < 10^3$	$10^3 < 10^4$	$10^4 < 10^5$	
$1:10^2$	5	1	1	2	0		3
$1:10^3$	3	2	7	3	3		0
$1:10^4$	6	0	1	2	1		2

Tabelle 8: Endotoxingehalt und Anzahl coliformer Keime in Rohmilch und mit E. coli O149:K91:K88 beimpfter Rohmilch unter Berücksichtigung des Einflusses einer Zelldesintegration mittels Zellaufbrechbombe

Art der Milchprobe	Endotoxintiter		Keimzahl/ml	
	ohne	mit	ohne	mit
	Zelldesintegration		Zelldesintegration	
Rohmilch	10^{-2}	10^{-2}	3×10^2	./.
Rohmilch nach 12 Std. bei 30°C	10^{-3}	10^{-5}	$2,2 \times 10^5$	./.
Rohmilch nach 24 Std. bei 30°C	10^{-5}	10^{-5}	$4,6 \times 10^5$	./.
Rohmilch beimpft	10^{-6}	10^{-6}	$5,8 \times 10^6$	./.
Rohmilch beimpft nach 12 Std. bei 30°C	10^{-7}	10^{-9}	$3,5 \times 10^9$	./.
Rohmilch beimpft nach 24 Std. bei 30°C	10^{-10}	10^{-10}	$3,8 \times 10^9$	./.

Zeichenerklärung: ./. = negativ in 1 ml

Tabelle 9: Endotoxingehalt und Anzahl coliformer Keime in pasteurisierter Milch und mit E. coli O149:K91:K88 beimpfter pasteurisierter Milch unter Berücksichtigung des Einflusses einer Zelldesintegration mittels Zellaufbrechbombe

Art der Milchprobe	Endotoxintiter		Keimzahl/ml	
	ohne Zelldesintegration	mit Zelldesintegration	ohne Zelldesintegration	mit Zelldesintegration
past. Milch	10^{-3}	10^{-3}	5×10^1	./.
past. Milch nach 12 Std. bei 30°C	10^{-4}	10^{-6}	$4,5 \times 10^4$	./.
past. Milch nach 24 Std. bei 30°C	10^{-6}	10^{-6}	5×10^4	./.
past. Milch beimpft	10^{-7}	10^{-8}	$5,2 \times 10^6$	./.
past. Milch beimpft 12 Std. bei 30°C	10^{-8}	10^{-10}	3×10^9	./.
past. Milch beimpft 24 Std. bei 30°C	10^{-10}	10^{-10}	$3,8 \times 10^6$	./.

Zeichenerklärung: ./. = negativ in 1 ml

Tabelle 10: Endotoxingehalt und Anzahl coliformer Keime vor und nach
Zelldesintegration in pasteurisierter Milch unter Berücksichtigung verschiedener Lagerungstemperaturen

Art der Milchprobe	Endotoxintiter		Keimzahl/ml	
	ohne Zelldesintegration	mit Zelldesintegration	ohne Zelldesintegration	mit Zelldesintegration
past. Milch	10^{-3}	10^{-3}	4×10^3	./.
past. Milch nach 24 Std. bei 5°C	10^{-4}	10^{-4}	$3,6 \times 10^3$	./.
past. Milch nach 24 Std. bei 25°C	10^{-6}	10^{-6}	3×10^5	./.

Zeichenerklärung: ./. = negativ in 1 ml

4. Diskussion

Endotoxine (Lipopolysaccharide) gramnegativer Keime sind lebensmittelhygienisch möglicherweise in zweifacher Hinsicht von Bedeutung, und zwar als Agens von Intoxikationen bzw. als Hygieneindikator (TERPLAN, 1974). Während in einer Vielzahl von Publikationen über die biologischen Wirkungen parenteral verabreichten Endotoxins berichtet wird (LANDY und BRAUN, 1964; KADIS, WEINBAUM und AJL, 1971; WEINBAUM, KADIS und AJL, 1971; KASS und WOLFF, 1973; URBASCHEK, URBASCHEK und NETER, 1975), ist die Wirkung oral aufgenommenen Endotoxine bisher relativ selten geprüft worden (MILNER, RUDBACH und RIBI, 1971). Einerseits wurde nach oraler Gabe von 6 bis 12 g abgetöteter Keime der Gattung *Aerobacter aerogenes* bei Testpersonen Erbrechen und Durchfall hervorgerufen (WASLIEN, CALLOWAY und MARGEN, 1969), andererseits wurden bei oraler Verabfolgung von Endotoxinen an gesunde, erwachsene Testpersonen (EMÖDY et al., 1974), Ratten (BERCZI, 1968; BERCZI et al., 1968) bzw. Schweine (JOHANNSEN, 1974) keine toxischen Effekte beobachtet. Nach DiLUZIO und FRIEDMANN (1973) dürfte die Aufnahme von Endotoxinen mit Trinkwasser oder Lebensmitteln kein Risiko für gesunde erwachsene Individuen beinhalten, bei denen die Absorption von Endotoxinen im Magen-Darm-Trakt begrenzt ist und denen funktionsfähige Mechanismen zur Entfernung und Inaktivierung von Endotoxinen zur Verfügung stehen, zumal auch in der normalen Dickdarmflora des Erwachsenen ständig endotoxinbildende Bakterien angesiedelt sind. Wenn allerdings Endotoxine infolge erhöhter Durchlässigkeit des Magen-Darm-Traktes in größeren Mengen absorbiert werden und gleichzeitig auch die Inaktivierungs- und Eliminierungsmechanismen des Körpers (RES) deutlich eingeschränkt sind, scheinen endotoxinbedingte Schäden durchaus im Bereich des Möglichen zu liegen. Hieran ist insbesondere bei Säuglingen zu denken (DiLUZIO und FRIEDMANN, 1973; MEIER und MARGET, 1974). Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß die Toxizität parenteral zugeführter Endotoxine im Zusammenwirken mit anderen mikrobiellen Stoffwechselprodukten, wie Enterotoxinen, Histamin, Histamin-Sensibilisierungs-Faktor von *Bordetella pertussis*, Antibiotika (TERPLAN, FEIST-KOHLER und ZAADHOF,

1976) oder Blei (DiLUZIO und FRIEDMANN, 1973; GANS und MATSUMOTO, 1975) potenziert wird und daß dieser Synergismus auch hinsichtlich der oral zugeführten Endotoxine nicht auszuschließen ist. Schließlich ist daran zu denken, daß Endotoxine - ohne selbst eine Erkrankung auszulösen - die Infektiosität und Mortalität bakterieller Infektionen deutlich steigern können (CLUFF, 1971; DiLUZIO und FRIEDMANN, 1973). Ein derartiger Zusammenhang wird z.B. für das "sudden infant death syndrome" angenommen.

Wenn Endotoxine auch keine Lebensmittelvergiftungen bei gesunden Erwachsenen verursachen sollten, so könnten sie doch als wichtige Hygieneindikatoren verwendet werden (TERPLAN, 1974). Dies gilt jedoch nur, wenn der zu ihrem Nachweis entwickelte hochempfindliche und innerhalb kurzer Zeit auswertbare Limulus-Test sich auch als spezifisch für Endotoxine gramnegativer Bakterien erweist. Eine weitere Voraussetzung für die Auswertbarkeit des Limulus-Tests zur Untersuchung von Lebensmitteln ist, daß die Reaktion nicht durch Lebensmittelbestandteile beeinflusst wird.

Es war daher von Interesse, festzustellen, ob mit dem Limulus-Test tatsächlich nur Endotoxine gramnegativer Bakterien erfaßt werden und ob während der verschiedenen Wachstumsphasen dieser Keime eine Beziehung zwischen Endotoxintiter und Anzahl kolonienbildender Einheiten besteht. Außerdem sollte geprüft werden, ob der Limulus-Test auch zum Nachweis von Endotoxinen in roher bzw. pasteurisierter Milch geeignet ist und ob der mit dem Limulus-Test ermittelte Endotoxintiter Indikator für die Anwesenheit coliformer Keime und damit für die hygienische Beschaffenheit und eventuell auch für die Behandlung vor der Erhitzung sein kann.

In an Bouillon-Reinkulturen von 49 gramnegativen bzw. 9 grampositiven Bakterien sowie zweier Hefestämme durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, daß der ursprünglich von LEVIN und BANG (1964 und 1968) beschriebene Limulus-Test, der als die einfachste, empfindlichste, billigste und schnellste Methode zum Nachweis von Endotoxinen angesehen wird (ROJAS-CORONA et al., 1969; COOPER, LEVIN und WAGNER, 1971; REINHOLD und FINE,

1971; YIN et al., 1972; RÖNNEBERGER und STÄRK, 1974; KRÜGER, ZIMMERMANN und HEBOLD, 1975; BEUSS et al., 1976), bei allen geprüften gramnegativen Stämmen (siehe auch Tabelle 1) positiv reagierte, während bei den grampositiven Stämmen und den beiden Hefestämmen keine positiven Resultate registriert werden konnten. Damit konnten die Untersuchungsergebnisse von BANG (1956), LEVIN und BANG (1964), REINHOLD und FINE (1971), JØRGENSEN und SMITH (1973 a), MALLINCKRODT (1974) und WILDFEUER et al. (1974 und 1975) bestätigt werden, die ebenfalls nur bei Kulturen gramnegativer Keime, nie aber bei grampositiven Bakterienstämmen und deren Stoffwechselprodukten bzw. bei Hefen einen positiven Limulus-Test beobachtet hatten. WILDFEUER et al. (1974 und 1975) hatten in diesem Zusammenhang auch darauf hingewiesen, daß aus der Zellwand einiger grampositiver Keime extrahierte Peptidoglycane zwar ebenfalls endotoxin-ähnliche Eigenschaften aufwiesen und in Modellversuchen eine Gelbildung des Amöbozyten-Lysats bewirkt hätten, daß aber die für einen positiven Test erforderlichen Konzentrationen 1000- bis 400 000fach höher seien als jene von *E. coli*-Lipopolysacchariden und diese normalerweise nicht zu erwarten seien.

Bei der Überwiegenden Mehrzahl der getesteten gramnegativen Stämme lag der Verdünnungsfaktor der 24 Stunden bebrüteten Bouillon, die noch einen positiven Limulus-Test (Nachweisgrenze: 0,05 ng *E. coli*-Endotoxin/ml) ergab, in der gleichen Zehnerpotenz wie die Keimzahl/ml. Nur in Ausnahmefällen war der positive Endotoxintiter um eine Zehnerpotenz größer als die Keimzahl. Berücksichtigt man die erheblichen Schwankungen beim Koch'schen Plattenverfahren und die Tatsache, daß bei Ermittlung des Endotoxingehaltes in Form des Endotoxintiters nur die Zehnerstufen registriert wurden, kann man davon ausgehen, daß nach 24stündiger Inkubation von Bouillonkulturen gramnegativer Keime vermutlich ein enger Zusammenhang zwischen Endotoxingehalt und Keimzahl gegeben ist.

In den sich anschließenden Modellversuchen mit *E. coli* O149:K91:K88 in Hirn-Herz-Bouillon sollte dann geklärt werden, wie sich Endotoxintiter

und Anzahl kolonienbildender Einheiten während der verschiedenen Wachstumsphasen des erwähnten Keimes verhalten. Dabei zeigte sich, daß die Keimzahl zu Versuchsbeginn (10^6 /ml) um drei Zehnerpotenzen höher lag als der positive Endotoxintiter. Erst nach 24stündiger Inkubation bei 30°C waren dann - nach allmählicher Angleichung der Werte - keine Unterschiede hinsichtlich der Zehnerpotenzen gegeben. Demnach war in den ersten Phasen des Wachstums von *E. coli* O149:K91:K88 nicht die enge Beziehung zwischen Keimzahl und Endotoxintiter gegeben, die aufgrund der Versuche zur Spezifität des Limulus-Tests an 24stündigen Kulturen verschiedener gram-negativer Bakterien vermutet worden waren. JORGENSEN und SMITH (1974) kamen allerdings bei ähnlicher Versuchsanordnung zu etwas anderen Ergebnissen. Sie beobachteten bei *E. coli* G-R bei 24stündiger Bebrütung bei 37°C stets - abgesehen von den ersten drei Stunden - ein gleich starkes Ansteigen von Endotoxingehalt und Keimzahl, und zwar von $3,2 \times 10^1$ ng/ml auf $1,4 \times 10^5$ ng/ml (Endotoxin) bzw. von 8×10^4 Keime/ml auf $1,4 \times 10^9$ /ml. Wahrscheinlich sind diese Unterschiede darauf zurückzuführen, daß das Endotoxinbildungsvermögen von Stamm zu Stamm differieren kann. Möglicherweise kommt zusätzlich auch der unterschiedlichen Bebrütungstemperatur eine Bedeutung zu.

Da die nach 24stündiger Inkubation beobachtete enge Beziehung zwischen Endotoxintiter und Keimzahl während der ersten Wachstumsphasen nicht registriert werden konnte, wurde in weiterführenden Versuchen geprüft, ob bei Freisetzung von Endotoxin durch Zerstörung der Zellwand junger Kulturen von *E. coli* ein besserer Zusammenhang zwischen Endotoxintiter und Keimzahl gegeben ist. Eine Zunahme des Endotoxintiters war zwar bei Erhitzung, Einfrieren bzw. Ultrabeschallung der Kulturen nicht gegeben, wohl aber bei 30minütiger Behandlung der Kulturen in einer Zellaufbrechbombe. Mit dieser Maßnahme konnte erreicht werden, daß bereits bei Versuchsbeginn die Zehnerlogarithmen von Endotoxintiter und der (vor der Zelldesintegration bestimmten) Keimzahl durchwegs übereinstimmten. Es ist daher davon auszugehen, daß während der ersten Wachstumsphasen das Endotoxin nur zu einem geringen Teil mit dem Limulus-Test nachgewiesen werden

kann, wenn nicht zuvor eine Zerstörung der Zellwand erfolgte. Zwar soll nach STUMACHER, KOVNAT und McCABE (1973), JORGENSEN et al. (1973) sowie JORGENSEN und SMITH (1974) auch "zellgebundenes" Endotoxin mit dem Limulus-Test erfaßt werden können, doch steigt im Laufe der Bebrütung insbesondere der Anteil an "freiem" Endotoxin im Medium an (JORGENSEN und SMITH, 1974). Hierauf dürfte auch zurückzuführen sein, daß die Desintegration bei 24 Stunden inkubierten Kulturen keinen Einfluß auf die Höhe des Endotoxintiters hatte.

Bereits in orientierenden Untersuchungen von grobsinnlich unveränderten Milchproben zeigte sich, daß eine Vorbehandlung der Milch vor Durchführung des Limulus-Tests zur Ausschaltung falschnegativer Resultate nicht notwendig ist. (Bei Untersuchungen von Blutproben ist eine Vorbehandlung unerläßlich, und zwar entweder in Form der Chloroformextraktion (LEVIN, TOMASULO und OSER, 1970) oder der Verdünnung des Blutplasmas mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1 bis 10% (LEVIN, TOMASULO und OSER, 1970) oder der pH-Veränderung (REINHOLD und FINE, 1971) oder der kombinierten pH-Veränderung und Verdünnung (MORAVEK et al., 1974)). Zum einen konnte nämlich Milchproben in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetztes Endotoxin ebenso wie in mit pyrogenfreiem Wasser hergestellten Vergleichsproben bis 0,05 ng/ml nachgewiesen werden. Zum anderen wurden in Milchproben nach Chloroformextraktion keine höheren Endotoxintiter registriert als in den zum Vergleich mitlaufenden Kontrollproben ohne Vorbehandlung. Die von HARTMANN, ZIV und SARAN (1976) insbesondere bei makroskopisch veränderter Milch (mit erhöhtem Gehalt an Serumproteinen) für erforderlich gehaltene Chloroformextraktion zur Entfernung eines Inhibitors konnte somit an dem eigenen Untersuchungsmaterial nicht bestätigt werden. DiLUZIO und FRIEDMANN (1973) hatten im übrigen ebenfalls nichts darüber mitgeteilt, daß dem Limulus-Test eine Extraktion vorhergehen müsse. Eine Beeinflussung des Limulus-Tests durch die Anwesenheit therapiebedingter Antibiotikarückstände in Milch kann ebenfalls ausgeschlossen werden (JORGENSEN et al., 1973; KRÜGER, ZIMMERMANN und HEBOLD, 1975; McCULLOUGH und SCOLNICK, 1976; eigene Versuche). Da bei den 29 unter

aseptischen Kautelen ermolkenen Viertelgemelksproben weder der Limulus-Test positive Resultate erbrachte noch coliforme Keime festgestellt werden konnten, kann auch davon ausgegangen werden, daß falschpositive Ergebnisse bei der Untersuchung von Milch nicht zu erwarten sind.

HARTMANN, ZIV und SARAN (1976) ermittelten zwar auch in 13 von 20 Viertelgemelksproben (normale Sekretion) eine positive Reaktion des Limulus-Tests in der Verdünnung 10^{-1} (Nachweisgrenze: 0,05 bis 0,1 ng/ml), doch enthält die Publikation keine Angaben darüber, ob diese Proben auch frei von coliformen bzw. gramnegativen Keimen waren.

Die Untersuchung der 166 Rohmilchproben (Anlieferungsmilch) ergab insgesamt eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Endotoxintiter und Anzahl coliformer Keime, da bei 156 Proben der Verdünnungsfaktor des Endotoxintiters dem Exponenten der Keimzahl/ml entsprach und bei den restlichen Proben nur eine Differenz von einer Zehnerpotenz gegeben war. Diese Übereinstimmung war bei der Untersuchung der pasteurisierten Milch jedoch nurmehr bei 7 von 39 Proben festzustellen. Bei den restlichen Proben waren die Verdünnungsfaktoren der Endtiter - zum Teil deutlich - höher als die Exponenten der Keimzahlen. Dies ist auch verständlich, da die Lipopolysaccharide äußerst hitzeresistent sind (WELCH et al., 1945; MILNER, RUDBACH und RIBI, 1971) und daher auch dann noch nachgewiesen werden können, wenn die gramnegativen Bakterien bereits abgetötet worden sind. Infolgedessen enthält auch frisch pasteurisierte coliformfreie Milch Endotoxine. Deren Konzentration nimmt dann bei der anschließenden Lagerung im allgemeinen noch zu, und zwar in Abhängigkeit von der Anzahl gramnegativer Bakterien, die auf dem Weg vom Erhitzer bis zur Abkühlung in die Milch gelangt sind und sich vermehren konnten. Inwieweit für die Unterschiede zwischen Endotoxintiter und Keimzahl möglicherweise auch mit dem angewandten Selektivmedium nicht erfaßte hitzegeschädigte coliforme Keime mitverantwortlich sind, muß in weiteren Untersuchungen noch geklärt werden.

Die in der Anlieferungsmilch und pasteurisierten Trinkmilch nachweisbaren Endotoxinkonzentrationen wurden anschließend unter Berücksichtigung der

Nachweisgrenze des Limulus-Tests (0,05 ng E. coli 055:B5-Endotoxin/ml) abgeschätzt. Danach lagen die Konzentrationen bei der Rohmilch im Bereich von 0,5 ng - 50 mcg/ml, bei der Trinkmilch im Bereich von 5 - 500 ng/ml. Diese Unterschiede zwischen Roh- und Trinkmilch lassen sich wahrscheinlich darauf zurückführen, daß die Rohmilchproben aus einzelnen Erzeugerbetrieben stammten, bis zur Entnahme zum Teil unkontrolliert gelagert worden waren und die Trinkmilchproben außerdem zum überwiegenden Teil nicht von der Molkerei waren, in deren Einzugsgebiet die Rohmilchproben entnommen worden waren. Die bei den eigenen Untersuchungen registrierten Endotoxinkonzentrationen liegen deutlich unter denen, die DiLUZIO und FRIEDMANN (1973) mit dem Limulus-Test in Milchproben aus New Orleans (30 bis 130 mcg/0,1 ml) fanden. Da diese Arbeit jedoch keine näheren Angaben über die Art und Herkunft der Proben sowie über ihren Gehalt an gramnegativen Keimen enthält und außerdem auch keine detaillierte Beschreibung der Untersuchungsmethodik vorliegt, ist es nicht möglich, zu beurteilen, wodurch die Unterschiede bedingt sein können.

Da, wie aus Versuchen zur Zelldesintegration (Tabellen 8 und 9) hervorgeht, bei Rohmilch bzw. pasteurisierter Milch der Verdünnungsfaktor der Milch, die einen positiven Limulus-Test erbrachte, und die Anzahl coliformer Keime stets in der gleichen Zehnerpotenz lagen und dieses Verhältnis Endotoxintiter:Keimzahl auch nach Zelldesintegration unverändert blieb, ist es - im Gegensatz zu frischen Bouillonkulturen gramnegativer Keime - offensichtlich nicht notwendig, Milchproben zur Bestimmung des Endotoxingehaltes zusätzlich einer Behandlung mit der Zellaufbrechbombe zu unterziehen. Zwar bewirkte die Desintegration der Bakterienzellen bei 12 Stunden bei 30°C gelagerten Proben roher bzw. pasteurisierter Milch eine Angleichung der zuvor um zwei Zehnerpotenzen differierenden Ergebnisse von Endotoxintiter und Anzahl coliformer Keime, doch dürfte eine Lagerung unter diesen Bedingungen in der Praxis kaum vorkommen. Bei 24stündiger Lagerung (5°C, 25°C, 30°C) war der Einsatz der Zellaufbrechbombe im übrigen - wie bereits bei den Bouillonkulturen - ohne Effekt.

Bestechendste Eigenschaft des Limulus-Tests ist die Erfassung der Gesamtheit der saprophytären gramnegativen Keime, womit - verglichen mit allen anderen mikrobiologischen und biochemischen Parametern - wohl die umfassendste Aussage über die hygienische Wertigkeit der Milch möglich ist. Aufgrund der bisherigen Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, daß sich coliforme Keime in Rohmilch bis herunter zu einem Gehalt von 50 bis 100/ml nachweisen lassen. Im Vergleich zu kulturellen Untersuchungsverfahren, selbst zu Schnellverfahren für coliforme Keime, ist die kurze Untersuchungszeit von 60 Minuten ein bisher nicht zu überbietender Vorteil des Endotoxinnachweises. Daneben ermöglicht das Verfahren die Erfassung der Keimbelastung vor und nach Erhitzung der Milch. Aussagen darüber, bis zu welchem Endotoxintiter eine Milchprobe noch als hygienisch einwandfrei beurteilt werden sollte, müssen noch geprüft werden. Sofern entsprechende Werte erarbeitet sind, könnte man sich auf die Untersuchung einer Verdünnungsstufe beschränken.

Nachteilig sind die Untersuchungskosten, die sich, sofern das Amöbozytenlysat nicht selbst hergestellt werden kann, bei Bezug des Lysats (Associates of Cape Cod, Woods Hole, Mass./USA) auf 2.— DM pro Titer belaufen. (In der BRD wird Amöbozytenlysat in Form des Lyophilisats "Pyrogen" von der Firma Byk-Mallinckrodt, Dietzenbach-Steinberg, vertrieben, dessen Einsatz noch erheblich kostenaufwendiger ist.) Reagenzien anderer Hersteller (E-Toxate^(R), Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo./USA; PyrotrolTM, Difco Laboratories, Detroit Mi./USA)) sind offensichtlich noch teurer. Möglicherweise kann der Limulus-Test mit Hilfe der modifizierten Mikromethode auf Objektträgern (FRAUCH, 1974 b) bzw. auf Deckgläsern (NGUYEN und GREPPIN, 1974; BEUSS et al., 1976), für die geringere Lysatmengen benötigt werden, so preiswert durchgeführt werden, daß er allgemein zum Einsatz kommen kann, z.B. auch in Molkereien. Allerdings setzt dieses Verfahren die Arbeit mit äußerst sauberen Geräten und pyrogenfreiem Wasser voraus. Hinsichtlich der Anwendung bei Milchprodukten, z.B. bei Milchpulver, sind noch weitere Untersuchungen erforderlich.

5. Zusammenfassung

1. Im ersten Versuchsabschnitt wurde die Eignung des Limulus-Tests zum Nachweis von Lipopolysacchariden (Endotoxinen) gramnegativer Keime in Reinkulturen von 49 gramnegativen bzw. neun grampositiven Bakterien- sowie zwei Hefestämmen geprüft. In Modellversuchen mit *E. coli* O149:K91:K88 wurde zu ermitteln versucht, ob während aller Wachstumsphasen eine Beziehung zwischen Reaktion im Limulus-Test (Sensitivität: 0,05 ng/ml) und Anzahl kolonienbildender Einheiten besteht.

Im zweiten Versuchsabschnitt wurden Rohmilch (29 unter aseptischen Kautelen ermolkenen Viertelgemelksproben bzw. 166 Anlieferungsmilchproben) und pasteurisierte Milch (39 Proben) mit dem Limulus-Test auf Anwesenheit von Endotoxinen und mit dem Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Laktose-Agar auf Gehalt an coliformen Keimen untersucht.

2. Der Limulus-Test verlief nur bei den 49 gramnegativen Bakterienstämmen positiv. In Bouillonkulturen ist der Endotoxintiter in der Anfangsphase niedriger als die entsprechende Keimzahl. Nach Zelldesintegration mit einer Zellaufbrechbombe wie auch mit zunehmendem Alter der Kulturen gleichen sich die Werte an.
3. In den 29 unter aseptischen Kautelen ermolkenen Viertelgemelksproben konnten weder Endotoxine noch coliforme Keime nachgewiesen werden. Bei den 166 Anlieferungsmilchproben entsprach der negative Exponent des Endotoxintiters in der Regel dem positiven Exponenten der Anzahl coliformer Keime/ml. Bei der pasteurisierten Milch war der negative Exponent des Endotoxintiters bei der Überwiegenden Mehrzahl der Proben höher als der positive Exponent der Anzahl coliformer Keime/ml, da die Endotoxine der bei der Pasteurisierung abgetöteten Keime ebenfalls erfaßt werden.

Summary

1. In the first part of the investigations the suitability of the Limulus test for the detection of lipopolysaccharides (endotoxins) was tested with pure cultures of 49 Gram-negative and 9 Gram-positive strains of bacteria as well as with pure cultures of 2 strains of yeasts. In model experiments with broth cultures of *E. coli* O149:K91:K88 it was tried to find out, if there is a correlation between reaction in the Limulus test (sensitivity: 0,05 ng/ml) and number of colonyforming units during the different phases of growth.

In the second part of the investigations raw milk (29 aseptically drawn quartermilk samples and 166 farm-delivered milk samples) and pasteurized milk (39 samples) were examined for the presence of endotoxins (Limulus test) and coliforms (violet red bile agar).

2. The Limulus test only showed positive results with the 49 strains of Gram-negative bacteria. The endotoxin-titer in broth cultures was in the initial phase of growth lower than the corresponding number of colonyforming units. The values equalled to another after cell disintegration with a cell disintegration bomb and with increasing age of the cultures.
3. Neither endotoxins nor coliforms could be detected in the 29 aseptically drawn quartermilk samples. In 166 raw milk samples the negative exponent of the endotoxin-titer was equal to the positive exponent of the number of coliforms/ml. In most of the pasteurized milk samples the negative exponent of the endotoxin-titer was higher than the positive exponent of the number of coliforms/ml, because the endotoxins of the cells killed during pasteurization react in the Limulus test, too.

6. Literaturverzeichnis

BANG, F.B. (1956):

A bacterial disease of *Limulus polyphemus*.

Bull. Johns Hopkins Hosp. 98, 325 - 337.

BERCZI, I. (1968):

Stability of *Escherichia coli* endotoxin in the rat gastro-intestinal tract.

J. Path. Bact. 96, 487 - 491.

BERCZI, I., L. BERTÓK, K. BAINNER und B. VERESS (1968):

Failure of oral *Escherichia coli* endotoxin to induce either specific tolerance or toxic symptoms in rats.

J. Path. Bact. 96, 481 - 486.

BERRY, J. (1966):

Effect of environmental temperature on lethality of endotoxin and its effect on body temperature in mice.

Fed. Proc. 25, 1264 - 1270.

DERSELBE (1971):

Metabolic effects of bacterial endotoxins.

in: KADIS, S., G. WEINBAUM und S.J. AJL:

Microbial Toxins, Bd. 5 (Bacterial Endotoxins), 165 - 204.

BEUSS, A., R. DOLDER, P. FRAUCH, T. GEBHART, R. GREPPIN, J. HERTIG und J. WIDMER (1976):

Studie zum Nachweis von Endotoxinen in Infusionslösungen mit dem Limulustest im Vergleich zum Pyrogentest am Kaninchen.

Pharm. Acta Helv. 51, 167 - 169.

BRYAN, F.T., C.W. ROBINSON, C.F. GILBERT und R.D. LANGDELL (1964):
N-Ethylmaleimide inhibition of horseshoe crab hemocyte agglutination.
Science 144, 1147 - 1148.

BUTLER, T., J. LEVIN, D.Q. CU und R.I. WALKER (1973):
Bubonic plague: Detection of endotoxemia with the Limulus test.
Ann. Intern. Med. 79, 642 - 646.

BUTLER, T., J. LEVIN, N.N. LINH, D.M. CHAU, M. ADICKMAN und
K. ARNOLD (1976):
Yersinia pestis infection in Vietnam. II. Quantitative blood cultures
and detection of endotoxin in the cerebrospinal fluid of patients with
meningitis.
J. Infect. Dis. 133, 493 - 499.

CARIDIS, D.T., R.B. REINHOLD, P.W.H. WOODRUFF und J. FINE (1972):
Endotoxaemia in man.
Lancet I, 1381 - 1386.

CLUFF, L.E. (1971):
Effects of lipopolysaccharides (endotoxins) on susceptibility to
infections.
in: KADIS, S., G. WEINBAUM und S.J. AJL:
Microbial Toxins, Bd. 5 (Bacterial Endotoxins), S. 399 - 413.

COOPER, J.F., H.D. HOCHSTEIN und E.B. SELIGMANN (1972):
The Limulus test for endotoxin (pyrogen) in radiopharmaceuticals and
biologicals.
Bull. Parenteral Drug Assoc. 26, 153 - 162.

COOPER, J.F., J. LEVIN und H.N. WAGNER (1971):
Quantitative comparison of in vitro and in vivo methods for the
detection of endotoxin.
J. Lab. Clin. Med. 78, 138 - 148.

CRUTCHLEY, M.J., D.G. MARSH und J. CAMERON (1967):

Free endotoxin.

Nature 214, 1052.

DIESELBEN (1968):

Biological studies on free endotoxin and a non-toxic material from culture supernatant fluids of *Escherichia coli* 078 K80.

J. gen. Microbiol. 50, 413 - 420.

CUEVAS, P. und J. FINE (1972):

Role of intrainestinal endotoxin in death from peritonitis.

Surg. Gynecol. Obstet. 134, 953 - 957.

CUNDY, K.R. und A. NOWOTNY (1968):

Comparison of five toxicity parameters of *Serratia marcescens* endotoxins.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 127, 999 - 1003.

DAS, J. und J. FOLKMAN (1975):

Limulus test.

N. Engl. J. Med. 293, 1102 - 1103.

DAS, J., A.A. SCHWARTZ und J. FOLKMAN (1973):

Clearance of endotoxin by platelets: Role in increasing the accuracy of the Limulus gelation test and in combating experimental endotoxemia.

Surgery 74, 235 - 240.

DiLUZIO, N.R. und T.J. FRIEDMANN (1973):

Bacterial endotoxins in the environment.

Nature 244, 49 - 51.

EIBERT, J. (1972):

Pyrogen testing: Horseshoe crabs vs. rabbits.

Bull. Parenteral Drug Assoc. 26, 253 - 260.

ELIN, R.J. und S.M. WOLFF (1973):

Nonspecificity of the Limulus amebocyte lysate test: Positive reactions with polynucleotides and proteins.

J. Infect. Dis. 128, 349 - 352.

ELIN, R.J., R.A. ROBINSON, A.S. LEVINE und S.M. WOLFF (1975):

Lack of clinical usefulness of the Limulus test in the diagnosis of endotoxemia.

N. Engl. J. Med. 293, 521 - 524.

EMÖDY, L., B. RALOVICH, K. BARNA, G. BRASCH und G. TERNAK (1974):

Physiological effect of orally administered endotoxin to man.

J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 18, 454 - 458.

FELDMAN, S. und T.A. PEARSON (1974):

The Limulus test and gram-negative bacillary sepsis.

Am. J. Dis. Child 128, 172 - 174.

FINKELSTEIN, R.A. (1964):

Observations on mode of action of endotoxin in chick embryos.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 115, 702 - 707.

FOSSARD, D.P. und V.V. KAKKAR (1974):

The Limulus test in experimental and clinical endotoxaemia.

Brit. J. Surg. 61, 798 - 804.

FOSSARD, D.P., V.V. KAKKAR und P.A. ELSEY (1974):

Assessment of Limulus test for detecting endotoxaemia.

Brit. Med. J. 2, 465 - 468.

FRASER, D. (1951):

Bursting bacteria by release of gas pressure.

Nature 167, 33 - 34.

FRAUCH, P. (1974 a):

Der Limulus-Test zum in vitro-Nachweis von Endotoxin.

Die Krankenhaus-Apotheke 24, 1 - 2.

DERSELBE (1974 b):

Slide test as a micromethod of a modified Limulus endotoxin test.

J. Pharm. Sci. 63, 808 - 809.

GALANDS, Ch. (1975):

Physical state and biological activity of lipopolysaccharides.

Toxicity and immunogenicity of the lipid A component.

Z. Immun.-Forsch. 149, 214 - 229.

GARIBALDI, R.A., G.W. ALLMAN, D.H. LARSEN, Ch.B. SMITH und J.P. BURKE (1973):

Detection of endotoxemia by the Limulus test in patients with indwelling urinary catheters.

J. Infect. Dis. 128, 551 - 554.

GANS, H. und M. MATSUMOTO (1974):

On the escape of endotoxin from the intestine.

in: URBASCHEK, B., R. URBASCHEK und E. NETER:

Gram-negative bacterial infections and mode of endotoxin actions, 429 - 435.

GREISMAN, S.E. und R.B. HORNICK (1969):

Comparative pyrogenic reactivity of rabbit and man to bacterial endotoxin.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 131, 1154 - 1158.

HARTMAN, I., G. ZIV und A. SARAN (1976):

Application of the *Limulus* amebocyte lysate test to the detection of gram-negative bacterial endotoxins in normal and mastitic milk.

Res. Vet. Sci. 20, 342 - 343.

HASKINS, W.T., M. LANDY, K.C. MILNER und E. RIBI (1961):

Biological properties of parent endotoxins and lipoid fractions, with a kinetic study of acid-hydrolyzed endotoxin.

J. Exptl. Med. 114, 665 - 684.

HOCHSTEIN, H.D., R.J. ELFIN, J.F. COOPER, E.B. SELIGMANN und S.M. WOLFF (1973):

Further developments of *Limulus* amebocyte lysate test.

Bull. Parenteral Drug Assoc. 27, 139 - 148.

HOLME, R. und N.O. SOLUM (1973):

Electron microscopy of the gel protein formed by clotting of *Limulus polyphemus* hemocyte extracts.

J. Ultrastruct. Res. 44, 329 - 338.

JAY, J.M. (1976):

Use of *Limulus* lysate endotoxin test to assess the microbial quality of ground beef.

Abstr. Am. Soc. Microbiol., p. 13.

JOHANNSEN, U. (1974):

Untersuchungen zur Pathologie und Pathogenese der spontanen Kolienterotoxämie und des experimentellen Koliendotoxinsyndroms der Schweine.

Arch. exp. Vet. med. 28, 889 - 903.

JOHNSON, K.G. und M.B. PERRY (1976):

Improved techniques for the preparation of bacterial lipopolysaccharides.

Can. J. Microbiol. 22, 29 - 34.

JONES, R.J., E.A. ROE und R.E. DYSTER (1975):

Detection of endotoxins with the Limulus test in burned and unburned mice infected with different species of gram-negative bacteria.

J. Hyg. (Camb.) 75, 99 - 113.

JORGENSEN, J.H. und P.M. JONES (1975):

Comparative evaluation of the Limulus assay and the direct gram stain for detection of significant bacteriuria.

Am. J. Clin. Pathol. 63, 142 - 148.

JORGENSEN, J.H. und R.F. SMITH (1972):

Abstr. Annual Meet. Amer. Soc. Microbiol. p. 92.

zit. nach JORGENSEN, J.H., H.F. CARVAJAL, B.E. CHIPPS und R.F. SMITH (1973).

DIESELBEN (1973 a):

Preparation, sensitivity and specificity of Limulus lysate for endotoxin assay.

Appl. Microbiol. 26, 43 - 48.

DIESELBEN (1973 b):

Rapid detection of contaminated intravenous fluids using the Limulus in vitro endotoxin assay.

Appl. Microbiol. 26, 521 - 524.

DIESELBEN (1974):

Measurement of bound and free endotoxin by the Limulus assay.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 146, 1024 - 1031.

JORGENSEN, J.H., J.C. LEE und H.R. PAHREN (1976):

Rapid detection of bacterial endotoxins in drinking water and renovated wastewater.

Appl. Environment. Microbiol. 32, 347 - 351.

JORGENSEN, J.H., H.F. CARVAJAL, B.E. CHIPPS und R.F. SMITH (1973):

Rapid detection of gram-negative bacteriuria by use of the Limulus endotoxin assay.

Appl. Microbiol. 26, 38 - 42.

KADIS, S., G. WEINBAUM und S.J. AJL (1971):

Microbial Toxins, Bd. 5 (Bacterial Endotoxins)

Academic Press, New York.

KASS, E.H. und S.M. WOLFF (1973):

Bacterial Lipopolysaccharides.

The University of Chicago Press, Chicago und London.

KEENE, W.R., H.S. SILBERMAN und M. LANDY (1961):

Observations on the pyrogenic response and its application to the bioassay of endotoxin.

J. Clin. Invest. 40, 295 - 301.

KRÜGER, D., G. ZIMMERMANN und G. HEBOLD (1975):

Ein Beitrag zur in-vitro-Pyrogenprüfung mittels des Limulus-Tests.

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 25, 160 - 162.

LANDY, M. und W. BRAUN (1964):

Bacterial Endotoxins.

Rutgers University Press, New Brunswick, N.J.

LARSON, C.L., E. RIBI, K.C. MILNER und J.E. LIEBERMAN (1960):

A method for titrating endotoxic activity in the skin of rabbit.

J. Exptl. Med. 111, 1 - 20.

LEVIN, J. (1967):

Blood coagulation and endotoxin in invertebrates.

Fed. Proc. 26, 1707 - 1712.

DERSELBE (1973):

Endotoxin and endotoxemia.

N. Engl. J. Med. 288, 1297 - 1298.

LEVIN, J. und F.B. BANG (1964):

The role of endotoxin in the extracellular coagulation of
Limulus blood.

Bull. Johns Hopkins Hosp. 115, 265 - 274.

DIESELBEN (1966):

Clottable protein in Limulus blood: Its localization and kinetics of
its coagulation by endotoxin.

Fed. Proc. 25, 497.

DIESELBEN (1968):

Clottable protein in Limulus: Its localization and kinetics of its
coagulation by endotoxin.

Thromb. Diath. Haemorrh. 19, 186 - 197.

LEVIN, J., P. TOMASULO und R.S. OSER (1970):

Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an
inhibitor.

J. Lab. Clin. Med. 25, 903 - 911.

LEVIN, J., T.E. POORE, N.P. ZAUBER und R.S. OSER (1970):
Detection of endotoxin in the blood of patients with sepsis
due to gram-negative bacteria.

N. Engl. J. Med. 283, 1313 - 1316.

LEVIN, J., T.E. POORE, N.S. YOUNG, S. MARGOLIS, N.P. ZAUBER,
A.S. TOWNES und W.R. BELL (1972):

Gram-negative sepsis: Detection of endotoxemia with the
Limulus test.

Ann. Int. Med. 76, 1 - 7.

LINDBERG, R.B., W.W. INGE, A.D. MASON und B.A. PRUITT (1972):

Natural variation in sensitivity of Limulus amoebocyte lysate to
endotoxin.

Fed. Proc. 31, 791.

LÜDERITZ, O. (1975):

Die Struktur der Lipopolysaccharide, der Pyrogene der gram-
negativen Bakterien.

Die Krankenhaus-Apotheke 4, 38.

LÜDERITZ, O., O. WESTPHAL, A.M. STAUB und H. NIKAIIDO (1971):

Isolation and chemical and immunological characterization of
bacterial lipopolysaccharides.

in: WEINBAUM, G., S. KADIS und S.J. AJL:

Microbial Toxins, Bd. 4 (Bacterial Endotoxins), 145 - 233.

LÜDERITZ, O., Ch. GALANOS, V. LEHMANN, M. NURMINEN, E.T. RIETSCHEL,
G. ROSENFELDER, M. SIMON und O. WESTPHAL (1973):

Lipid A: Chemical structure and biological activity.

J. Infect. Dis. 128, S17 - S29.

MALLINCKRODT (1974):

Untersuchungsbericht über Pyrogen^(R).

Mallinckrodt Chemical Works, St. Louis.

MARCUS, S. (1975):

Alternative Pyrogen-Tests.

Die Krankenhaus-Apotheke 4, 38 - 39.

MARTIN, W.J. und S. MARCUS (1964):

Studies on bacterial pyrogenicity. III. Specificity of the United States Pharmacopeia rabbit pyrogen test.

Appl. Microbiol. 12, 483 - 486.

MARTINEZ-G, L.A., R. QUINTILIANI und R.C. TILTON (1973):

Clinical experience on the detection of endotoxemia with the Limulus test.

J. Infect. Dis. 127, 102 - 105.

McCULLOUGH, K.Z. und S.A. SCOLNICK (1976):

Effect of semisynthetic penicillins on the Limulus lysate test.

Antimicrob. Agents Chemother. 9, 856 - 858.

MEIER, S.U. und W. MARGET (1974):

Sind quantitativ erfaßbare Mengen von Coli-Endotoxin in pulverisierter Säuglingsnahrung enthalten?

Klin. Pädiat. 186, 154 - 158.

MILNER, K.C. und R.A. FINKELSTEIN (1966):

Bioassay of endotoxin: Correlation between pyrogenicity for rabbits and lethality for chick embryos.

J. Infect. Dis. 116, 529 - 536.

MILNER, K.C., J.A. RUDBACH und E. RIBI (1971):

General characteristics.

in: WEINBAUM, G., S. KADIS und S.J. AJL:

Microbial Toxins, Bd. 4 (Bacterial Endotoxins), 1 - 65.

MORÁVEK, J., Z. KONIČKOVÁ, J. SEDLÁK und V. MATEJIČEK (1974):

Detection of endotoxin in human plasma.

J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 18, 462 - 464.

NACHUM, R., A. LIPSEY und S.E. SIEGEL (1973):

Rapid detection of gram-negative bacterial meningitis by the Limulus lysate test.

N. Engl. J. Med. 289, 931 - 934.

NGUYEN, B.T. und R. GREPPIN (1974):

Schweiz. Apoth. Ztg. 112, 474

zit. nach BEUSS, A., R. DOLDER, P. FRAUCH, T. GEBHART, R. GREPPIN,
J. HERTIG und J. WIDMER (1976).

NOWOTNY, A. (1969):

Molecular aspects of endotoxic reactions.

Bacteriol. Rev. 33, 72 - 98.

DERSELBE (1971):

Relationship of structure and biologic activity of bacterial endotoxins.

Naturwissenschaften 58, 397 - 409.

OBERLE, M.W., G.G. GRAHAM und J. LEVIN (1974):

Detection of endotoxemia with the Limulus test: Preliminary studies in severely malnourished children.

J. Pediatr. 85, 570 - 573.

RADVANY, R., N.L. NEALE und A. NOWOTNY (1966):
Relation of structure to function in bacterial O-antigens.
VI. Neutralization of endotoxic O-antigens by homologous
O-antibody.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 133, 763 - 786.

RAYNAUD, M. und J.E. ALOUF (1970):
Intracellular versus extracellular toxins.
in: AJL, S.J., S. KADIS und T.C. MONTIE:
Microbial Toxins, Bd. 1 (Bacterial Protein Toxins), 67 - 117.

REINHOLD, R.B. und J. FINE (1971):
A technique for quantitative measurement of endotoxin
in human plasma.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 137, 334 - 340.

RIBI, E., K.C. MILNER und T.D. PERRINE (1959):
Endotoxic and antigenic fractions from the cell wall of *Salmonella*
enteritidis. Methods for separation and some biological activities.
J. Immunol. 82, 75 - 84.

RIBI, E., R.L. ANACKER, K. FUKUSHI, W.T. HASKINS, M. LANDY und
K.C. MILNER (1964):
Relationship of chemical composition to biological activity.
in: LANDY, M. und W. BRAUN: Bacterial Endotoxins.
Rutgers University Press, New Brunswick, N.J., S. 16 - 28.

RIETSCHEL, E. Th. und O. LÜDERITZ (1975):
Chemical structure of lipopolysaccharides and endotoxin immunity.
Z. Immun.-Forsch. 149, 201 - 213.

ROJAS-CORONA, R.R., R. SKARNES, S. TAMAKUMA und J. FINE (1969):
The *Limulus* coagulation test for endotoxin. A comparison with
other assay methods.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 132, 599 - 601.

RONNEBERGER, H. und J. STÄRK (1974):

Der Limulus-Test im Vergleich mit dem Pyrogentest am Kaninchen.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 24, 933 - 934.

ROSS, S., W. RODRIQUES, G. CONTRONI, G. KORENGOLD, S. WATSON
und W. KHAN (1975):

Limulus lysate test for gram-negative bacterial meningitis.
J. Am. Med. Assoc. 233, 1366 - 1369.

ROWE, M.I., D.M. BUCKNER und S. NEWMARK (1975):

The early diagnosis of gram-negative septicemia in the
pediatric surgical patient.
Ann. Surg. 182, 280 - 286.

SCHAEGLER, R.W. und R.J. DUBOS (1962):

The fecal flora of various strains of mice. Its bearing on
their susceptibility to endotoxin.
J. Exptl. Med. 115, 1149 - 1159

SEDLÁK, J. und J. MORÁVEK (1974):

Lethal effect of lipopolysaccharides (endotoxins) of various
enterobacteria.
J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 18, 459 - 461.

SEDLÁK, J. und H. RISCHE (1969):

Enterobacteriaceae-Infektionen.
Epidemiologie und Laboratoriumsdiagnostik.
Edition Leipzig.

SELZER, G.B. (1970):

Preparation of a purified lipopolysaccharide for pyrogen testing.
Bull. Parenteral Drug Assoc. 24, 153 - 156.

SHIRODKAR, M.V., A. WARWICK und F.B. BANG (1960):

The in vitro reaction of Limulus amoebocytes to bacteria.

Biol. Bull. 118, 324 - 337.

SMITH, R.T. und L. THOMAS (1956):

The lethal effect of endotoxins on the chick embryo.

J. Exptl. Med. 104, 217 - 231.

SOLUM, N.O. (1970):

Some characteristics of the clottable protein of Limulus polyphemus blood cells.

Thromb. 23, 170 - 181.

DERSELBE (1973):

The coagulogen of Limulus polyphemus hemocytes. A comparison of the clotted and non-clotted forms of the molecule.

Thromb. Res. 2, 55 - 70.

STUMACHER, R.J., M.J. KOVNAT und W.R. McCABE (1973):

Limitations of the usefulness of the Limulus assay for endotoxin.

N. Engl. J. Med. 288, 1261 - 1264.

SULLIVAN, J.D. und S.W. WATSON (1974):

Factors affecting the sensitivity of Limulus lysate.

Appl. Microbiol. 28, 1023 - 1026.

DIESELBEN (1975 a):

Inhibitory effect of heparin on the Limulus test for endotoxin.

J. Clin. Microbiol. 2, 151.

DIESELBEN (1975 b):

Purification and properties of the clotting enzyme from
Limulus lysate.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 66, 848 - 855.

SULZER, B.M. (1971):

Chemical modification of endotoxin and inactivation of its
biological properties.

in: KADIS, S., G. WEINBAUM und S.J. AJL:

Microbial Toxins, Bd. 5 (Bacterial Endotoxins), S. 91 - 126.

TAYLOR, A., K.W. KNOX und E. WORK (1966):

Chemical and biological properties of an extracellular lipo-
polysaccharide from *Escherichia coli* grown under Lysine-
limiting conditions.

Biochem. J. 99, 53 - 61.

TERPLAN, G. (1974):

Microbial toxins.

IX. Int. Symposium IAMS, 16. - 20. September, Kiel.

TERPLAN, G., J. FEIST-KOHLER und K.-J. ZAADHOF (1976):

Wechselwirkung mikrobieller Toxine im Säugetierorganismus
unter besonderer Berücksichtigung synergistischer Effekte.
Gutachten.

TERPLAN, G., K.-J. ZAADHOF und S. BUCHHOLZ-BERCHTOLD (1975):

Zum Nachweis von Endotoxinen gramnegativer Keime in Milch mit
dem *Limulus*-Test.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 217 - 221.

TRIPPODO, N.C., J.H. JORGENSEN und L.L. PRIANO (1973):

Cerebrospinal fluid levels of endotoxin during endotoxemia.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 143, 932 - 937.

URBASCHEK, B. (1976):

Zur Frage der pathogenetischen Bedeutung von Endotoxinen bei Infektionen mit gramnegativen Bakterien.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 235, 26 - 35.

URBASCHEK, B., R. URBASCHEK und E. NETER (1975):

Gram-Negative Bacterial Infections and Mode of Endotoxin Actions.

Springer-Verlag, Wien - New York.

WARD, P.A. und J.H. HILL (1972):

Detection of lipopolysaccharide (LPS): An improved method for isolation of the Limulus extract.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 141, 898 - 900.

WASLIEN, C.I., D.H. CALLOWAY und S. MARGEN (1969):

zit. nach: MILNER, K.G., J.A. RUDBACH und E. RIBI (1971):

General characteristics.

in: WEINBAUM, G., S. KADIS und S.J. AJL:

Microbial Toxins, Bd. 4 (Bacterial Endotoxins), S. 1 - 65.

WEINBAUM, G., S. KADIS und S.J. AJL (1971):

Microbial Toxins, Bd. 4 (Bacterial Endotoxins)

Academic Press, New York.

WELCH, H., C.W. PRICE, V.L. CHANDLER und A.C. HUNTER (1945):

J. Am. Pharm. Assoc. 34, 114

zit. nach MILNER, K.C., J.A. RUDBACH und E. RIBI (1971).

WESTPHAL, O. (1975):

Bacterial endotoxins.

Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 49, 1 - 43.

WESTPHAL, O. und O. LÜDERITZ (1954):

Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien.

Angew. Chemie 66, 407 - 417.

WESTPHAL, O., I. BECKMANN, K. HÄMMERLING, B. JANN, K. JANN und O. LÜDERITZ (1964):

Recent investigations on the polysaccharide component of enterobacterial endotoxins (S and R forms).

in: LANDY, M. und W. BRAUN: Bacterial Endotoxins.

Rutgers University Press, New Brunswick, N.J., 1 - 16.

WILDFEUER, A., B. HEYMER, K.H. SCHLEIFER und O. HAERKAMP (1974):

Investigations on the specificity of the Limulus test for the detection of endotoxin.

Appl. Microbiol. 28, 867 - 871.

WILDFEUER, A., B. HEYMER, D. SPILKER, K.H. SCHLEIFER, E. VANEK und O. HAERKAMP (1975):

Use of Limulus assay to compare the biological activity of peptidoglycan and endotoxin.

Z. Immun.-Forsch. 149, 258 - 264.

WOLFF, S.M., J.H. MULHOLLAND und S.B. WARD (1965):

Quantitative aspects of the pyrogenic response of rabbits to endotoxin.

J. Lab. Clin. Med. 65, 268 - 276.

YIN, E.T. (1975):

Endotoxin, thrombin, and the Limulus amoebocyte.

J. Lab. Clin. Med. 86, 430 - 434.

YIN, E.T., Ch. GALANDOS, S. KINSKY, R.A. BRADSHAW, S. WESSLER,
O. LÜDERITZ und M.E. SARMIENTO (1972):

Picogram-sensitive assay for endotoxin: Gelation of *Limulus*
polyphemus blood cell lysate induced by purified lipopoly-
saccharides and lipid A from gram-negative bacteria.

Biochim. Biophys. Acta 261, 284 - 289.

YOUNG, N.S., J. LEVIN und R.A. PRENDERGAST (1972):

An invertebrate coagulation system activated by endotoxin:
Evidence for enzymatic mediation.

J. Clin. Invest. 51, 1790 - 1797.

Abschließend möchte ich Herrn Professor Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gewährte Anleitung und Unterstützung bei der Ausführung meiner Arbeit meinen Dank aussprechen.

Besonders herzlich danke ich auch Herrn Dr. K.-J. Zaadhof für seine stete Hilfsbereitschaft und Beratung bei meinen Untersuchungen und der Durchsicht meiner Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für ihre immer gern gewährte Hilfeleistung.

Lebenslauf

Am 20. September 1945 wurde ich als erstes Kind des Dipl. Ing. Arch. Richard Berchtold und seiner Ehefrau Dr. med. Hildegard Berchtold, geb. Miketta, in Tegernsee geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in Rottach-Egern am Tegernsee von 1952 bis 1957 besuchte ich bis Juli 1962 das Gymnasium mit Oberrealschule in Tegernsee. Im September 1962 trat ich in das Gymnasium der armen Schulschwestern am Anger in München ein, wo ich am 21. Juli 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Im Winter 1967 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Studium der Tiermedizin, das ich am 4. Februar 1974 mit der Tierärztlichen Prüfung abschloß.

Am 27. Februar 1974 ehelichte ich den Dipl. math. Dr. Wilfried Buchholz.

Am 16. September 1975 erhielt ich die Bestallung als Tierärztin.

